

**Untersuchung der Kohlenstoff- und Stickstoffallokation
bei *Hordeum vulgare* L. im frühen Zeitraum nach der
Anthese**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum agriculturalarum
(Dr. rer. agr.)**

eingereicht an der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologe Harald Keller

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät

Prof. Dr. Dr. h.c. Frank Ellmer

Gutachter:

1. Prof. Dr. Helmut Herzog
2. Prof. Dr. habil. Eckhard George
3. Prof. Dr. Bernhard Grimm

Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2012

Zusammenfassung

Getreide stellt die Grundlage der menschlichen Ernährung dar. Gerste (*Hordeum vulgare* L.) ist hinsichtlich der Produktion und Anbaufläche auf globaler Ebene die viertwichtigste Getreideart und gehört zu den zehn wichtigsten Nutzpflanzen [128]. Durch ihre Nutzung als Braugerste oder Futtergerste ergeben sich besondere Ansprüche an den Proteingehalt sowie die Proteinqualität im Gerstenkorn. Die Mechanismen, welche die Akkumulation von Protein und dessen Zusammensetzung steuern, sind jedoch nicht vollständig bekannt. Diese Arbeit liefert einen Beitrag zum Verständnis der Vorgänge im frühen Zeitraum nach Anthese auf der Gesamt-Pflanzenebene, welche zur Akkumulation von Kohlenstoff und Stickstoff im Endosperm führen. Durch die Einbettung in ein systembiologisches Projekt tragen die gewonnenen Daten zur Etablierung eines Modells bei, mit welchem Vorhersagen der Auswirkungen genetischer Veränderungen im Endospermstoffwechsel auf Kornertrag und -zusammensetzung ermöglicht werden.

Zur Klärung der Fragestellungen in dieser Dissertation wurde die C- und N-Verlagerung in Pflanzen der Sorte 'Bomi' sowie den *low-starch*-Mutanten Risø 16 und Risø 13 zu 8, 14 und 20 Tagen nach Anthese in Gefäßversuchen unter kontrollierten Umweltbedingungen untersucht. Im Fokus standen die Vorgänge im Endosperm. Für die Termine 14 und 20 Tage nach Anthese wurde daher die Zusammensetzung des Proteins nach Fraktionierung in Albumine/Globuline, Hordeine und Gluteline analysiert. Mittels ^{13}C - und ^{15}N *in vivo* Doppel-Pulsmarkierung ganzer Pflanzen erfolgte die Untersuchung des Beitrages der aktuellen C- und N-Assimilation zur Endospermentwicklung.

Der C-Massenanteil in den vegetativen Organen blieb im Untersuchungszeitraum konstant und zeigte keine Unterschiede zwischen den Genotypen. Somit konnte keine C-Remobilisierung festgestellt werden. Dahingegen wurde bei 'Bomi' und Risø 16 eine Mobilisierung von Stickstoff in den vegetativen Organen nachgewiesen. Diese fand bei den Genotypen in unterschiedlichem Ausmaß statt. Die N-Abnahme zwischen 8 dpa und 20 dpa in der Sprossachse von 'Bomi' und den Blättern von Risø 16 korrelierte mit der N-Zunahme in deren Endospermen. Die Frischmasse der Endosperme nahm von 8 bis 20 dpa

linear zu und es wurden keine Unterschiede zwischen den Genotypen nachgewiesen. Die Trockenmasse stieg in gleicher Weise an, jedoch fiel sie im Mittel beider Mutanten zu 20 dpa gegenüber 'Bomi' 17 % niedriger aus. Dies zeigt ein geringeres Vermögen zur Akkumulation von Trockenmasse bei Risø 16 und Risø 13. Die Einlagerung von aktuell assimiliertem ^{13}C und ^{15}N in das Endosperm stieg im Untersuchungszeitraum an. In den vegetativen Organen wurde hingegen von 8 zu 20 Tagen nach Anthese eine abnehmende Einlagerung aktuell assimilierten Stickstoffs festgestellt, während sich die Einlagerung von ^{13}C nicht änderte. Somit stieg die aktuelle Assimilation von C und N nach Anthese an oder die Verteilung der Assimilate zwischen Haupttrieb und Bestockungstrieben änderte sich. Es zeigte sich weiterhin, dass die C- und N-Einlagerung in das Endosperm nicht komplett unabhängig erfolgten wie es für Gerste und Weizen in anderen Studien berichtet wurde [49, 131, 132, 133, 126, 62]. Die Analyse der verschiedenen Proteinfractionen des Endosperms offenbarte, dass deren Bildungsdynamik und Zusammensetzung von Veränderungen im Stärkemetabolismus beeinflusst wird. Die Albumin/Globulin-Menge pro Endosperm betrug bei Risø 16 bzw. Risø 13 zu 14 dpa das 3,5- und 1,9-fache des Wertes von 'Bomi'. Sie stieg beim Wildtyp bis 20 dpa an, während sie bei den Mutanten zumindest tendenziell sank. Weiterhin fiel die Hordeinmenge im Mittel beider Mutanten gegenüber 'Bomi' zu 14 dpa 57 % und 20 dpa 38 % niedriger aus. Für die Glutelinmenge zeigte sich erst zu 20 dpa ein Unterschied, wobei der Wert von Risø 16 und Risø 13 37 % bzw. 29 % höher lag als jener des Wildtyps.

Schlagworte: Gerste, Endosperm, Proteinfractionen, ^{13}C , ^{15}N , 'Bomi', *low-starch*-Mutanten

Abstract

Cereals are the basis of human nutrition. Barley (*Hordeum vulgare* L.) is globally the fourth most important cereal and among the top ten crops with regard to production and acreage [128]. There are special requirements for protein content and quality in barley grain, depending on the use for malt production or as animal feed. The mechanisms controlling the accumulation and composition of grain protein are not completely understood yet. This thesis aims to further the understanding of the processes that affect the accumulation of carbon and nitrogen in the endosperm in the early stage of its development on a whole-plant level. By being embedded in a systems biological project the obtained data will help to establish a model, which can predict the effects of genetic manipulations in endosperm metabolism on grain yield and composition.

The C- and N allocation was examined at 8, 14 and 20 days post anthesis (dpa) in the barley cultivar 'Bomi' and the low-starch mutants Risø 16 as well as Risø 13 in pot experiments under controlled environmental conditions. The endosperm was in the focus of interest. Therefore the composition of its protein was determined at 14 and 20 dpa by fractionation in albumins/globulins, hordeins and glutelins. Furthermore the contribution of current C- and N assimilation to endosperm development was investigated by employing ^{13}C - and ^{15}N *in vivo* double pulse-labelling of whole plants.

The C content in the vegetative organs was constant during the investigation period and no differences between the genotypes were observed. Thus no C remobilisation occurred. On the other hand a mobilization of nitrogen in the vegetative organs was proved for 'Bomi' and Risø 16, although to a different extent. The decreasing N content in the shoot of 'Bomi' and the leaves of Risø 16 correlated with the N increase in their endosperms. The fresh weight of the endosperms was increasing linearly between 8 and 20 dpa without any genotypical differences. The progress of dry weight was very similar, but 20 dpa it was on average 17 % lower for the mutants compared to 'Bomi'. This shows the lower ability to accumulate dry matter in the endosperm of Risø 16 and Risø 13 although the sink capacity was comparable to 'Bomi'. Incorporation of currently assimilated ^{13}C and ^{15}N in the endosperm increased during

the investigation period. At the same time incorporation of ^{15}N in the vegetative organs was decreasing while the ^{13}C content was constant. This means that either the assimilation of C and N increased from 8 to 20 dpa or the distribution of assimilates between main shoot and tillers changed. Furthermore there were, in contrast to other reports for barley and wheat [49, 131, 132, 133, 126, 62], strong indications that C- and N incorporation in the endosperm were not completely independent from each other. The analysis of the endosperm protein revealed that its composition as well as the formation dynamics and the amount of the single fractions were influenced by the changes in starch metabolism. The amount of albumin/globulin per endosperm of Risø 16 and Risø 13 at 14 dpa was 3.5 and 1.9-fold higher as compared with 'Bomi'. In the following 6 days it rose for the wildtype, while it tended to decrease for the mutants. Furthermore the amount of hordeins (mean value of both) in the endosperm of the mutants was 57 % and 38 % lower than that of 'Bomi' at 14 dpa and 20 dpa, respectively. The amounts of glutelins were not distinct between genotypes at 14 dpa but at 20 dpa with 37 % and 29 % higher values compared with 'Bomi' for Risø 16 and Risø 13, respectively.

Keywords: barley, endosperm, protein fractions, ^{13}C , ^{15}N , 'Bomi', *low-starch* mutants

Für Emma

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	II
Abstract.....	IV
Inhaltsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis.....	X
Tabellenverzeichnis	XIV
Abkürzungsverzeichnis.....	XVI
1 Einleitung	17
1.1 Gerste (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	17
1.1.1 Herkunft und Bedeutung	17
1.1.2 Umweltansprüche	18
1.1.3 Klassifizierung	19
1.1.4 Taxonomie und Morphologie	20
1.1.5 Das Endosperm der Gerste	21
1.1.6 Inhaltstoffe im Gerstenkorn	22
1.1.6.1 Die Stärkefraktion	23
1.1.6.2 Die Proteinfraction	24
1.2 Stabile Isotope	27
2 Zielstellung dieser Arbeit.....	34
3 Material und Methoden	36
3.1 Pflanzenmaterial.....	36
3.2 Versuchsfragen, -aufbau und -bedingungen.....	37
3.3 <i>In vivo</i> ¹³ C- und ¹⁵ N-Doppelmarkierung.....	40
3.4 Bestimmung des Antheszeitpunktes.....	42
3.5 Probenahme, Endospermpräparation und Probenaufarbeitung	45
3.6 Fraktionierung des Endosperms	46
3.7 Probenanalytik	48

VIII

3.7.1 Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl.....	49
3.7.2 ^{15}N -Bestimmung	51
3.7.3 Simultane Bestimmung von Gesamt-C und -N	52
3.7.4 ^{13}C -Bestimmung.....	52
3.8 Statistik.....	53
4 Ergebnisse	56
4.1 Untersuchungen am Haupttrieb.....	56
4.1.1 Vegetative Organe – Trockenmasseentwicklung	56
4.1.2 Vegetative Organe – Gesamt-C und ^{13}C -Anreicherung	58
4.1.3 Vegetative Organe – Gesamt-N und ^{15}N -Anreicherung	66
4.1.4 Endosperm – Frisch- und Trockenmasse	75
4.1.5 Endosperm – ^{13}C -Anreicherung	78
4.1.6 Endosperm – Gesamt-N und ^{15}N -Überschuss	80
4.1.7 Die Zusammensetzung des reifen Korns	86
4.1.8 Proteinfraktionen des Endosperms – Gesamt-N und ^{15}N - Überschuss	87
4.1.9 Proteinextraktion - Reinheit der Fraktionen und N- Wiederfindung	102
4.1.10 Einfluss der ^{13}C -/ ^{15}N -Doppelmarkierung.....	104
4.2 Untersuchungen an den Bestockungstrieben	106
5 Diskussion	111
5.1 Trockenmasse	111
5.2 Gesamt-C	114
5.3 ^{13}C – Vier Tage vor Probenahme assimilierter Kohlenstoff	116
5.4 Gesamt-N	122
5.5 ^{15}N – Vier Tage vor Probenahme assimilierter Stickstoff.....	131
5.6 Die Proteinfraktionen des Endosperms	136
5.7 Bewertung des Verfahrens zur Proteinextraktion.....	146
5.8 Bewertung der ^{13}C -/ ^{15}N -Doppelmarkierung	148
5.9 Bestockungstriebe.....	151

6 Schlussfolgerungen	156
Anhang I.....	159
Literaturverzeichnis.....	167
Danksagung.....	180

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Quer- und Längsschnitt durch eine Gerstenkaryopse	22
Abb. 2: Schema der Stoffwechselwege zur Stärkesynthese im Endosperm ..	24
Abb. 3: Schematische Darstellung des Morse-Potentials für ein zweiatomiges Molekül	32
Abb. 4: Einzelparzelle im zweiten Hauptversuch 2010	39
Abb. 5: Gesamtansicht des zweiten Hauptversuches 2010	40
Abb. 6: Trockenmasseanteile der Isotopen ^{15}N und ^{13}C in Karyopsen von <i>Hordeum vulgare</i> cv. 'Auriga' im zeitlichen Verlauf nach der Markierung....	41
Abb. 7: Blüte von <i>Hordeum vulgare</i> L. zum Zeitpunkt der Anthese.....	44
Abb. 8: Mittlere Trockenmassen der vegetativen Organe des Haupttriebes für die Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 im ersten Hauptversuch	57
Abb. 9: Vergleich der mittleren Trockenmassen der Sprossachsen und Blätter des Haupttriebes zu 20 dpa aus den Versuchen 2009 und 2010.....	58
Abb. 10: C-Mengen in den vegetativen Organen des Haupttriebes der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 im ersten Hauptversuch	59
Abb. 11: Vergleich der C-Menge in den Sprossachsen der Haupttriebe zu 20 dpa aus den Versuchen 2009 und 2010.....	60
Abb. 12: C-Massenanteile in den vegetativen Organen des Haupttriebes der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 im ersten Hauptversuch	61
Abb. 13: Vergleich der C-Massenanteile in den Sprossachsen der Haupttriebe zu 20 dpa aus den Versuchen 2009 und 2010	62
Abb. 14: ^{13}C -Überschuss in den vegetativen Organen des Haupttriebes der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 im ersten Hauptversuch	63
Abb. 15: Vergleich des ^{13}C -Überschusses in den Sprossachsen der Haupttriebe zu 20 dpa aus den Versuchen 2009 und 2010	64
Abb. 16: ^{13}C -Trockenmasseanteil in den vegetativen Organen des Haupttriebes der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 im ersten Hauptversuch.....	65

Abb. 17: Vergleich der ^{13}C -Trockenmasseanteile in den Sprossachsen der Haupttriebe zu 20 dpa aus den Versuchen 2009 und 2010.....	66
Abb. 18: N-Menge in den vegetativen Organen des Haupttriebes der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 im ersten Hauptversuch.....	67
Abb. 19: Vergleich der N-Menge in den Sprossachsen der Haupttriebe zu 20 dpa aus den Versuchen 2009 und 2010	68
Abb. 20: N-Massenanteile in den vegetativen Organen des Haupttriebes der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 im ersten Hauptversuch.....	69
Abb. 21: Vergleich der N-Massenanteile in den Sprossachsen der Haupttriebe zu 20 dpa aus den Versuchen 2009 und 2010.....	70
Abb. 22: ^{15}N -Überschuss in den vegetativen Organen des Haupttriebes der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 im ersten Hauptversuch.....	71
Abb. 23: Vergleich des ^{15}N -Überschusses in den Sprossachsen der Haupttriebe zu 20 dpa aus den Versuchen 2009 und 2010.....	72
Abb. 24: ^{15}N -Trockenmasseanteil in den vegetativen Organen des Haupttriebes der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 im ersten Hauptversuch	74
Abb. 25: Vergleich der ^{15}N -Trockenmasseanteile in den Sprossachsen der Haupttriebe zu 20 dpa aus den Versuchen 2009 und 2010.....	74
Abb. 26: Frischmasse pro Endosperm (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 8, 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch.....	76
Abb. 27: Trockenmasse pro Endosperm (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 8, 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch.....	77
Abb. 28: Wassergehalt pro Endosperm (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 8, 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch.....	77
Abb. 29: Vergleich der mittleren Endospermtrockenmassen der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 20 dpa (Haupttrieb) aus den Versuchen 2009 und 2010	78
Abb. 30: ^{13}C -Anreicherung über dem Standard pro Endosperm (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 8, 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch	79

XII

- Abb. 31: Vergleich der mittleren ^{13}C -Anreicherung über dem Standard pro Endosperm (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 20 dpa aus den Versuchen 2009 und 2010..... 80
- Abb. 32: N-Menge pro Endosperm (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 8, 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch..... 81
- Abb. 33: N-Trockenmasseanteil pro Endosperm (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 8, 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch 82
- Abb. 34: ^{15}N -Überschuss pro Endosperm (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 8, 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch 84
- Abb. 35: ^{15}N -Trockenmasseanteil pro Endosperm (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 8, 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch 85
- Abb. 36: N-Menge der Proteinfractionen pro Endosperm (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch..... 89
- Abb. 37: Vergleich der Versuche 2009 und 2010 hinsichtlich der N-Menge der Proteinfractionen pro Endosperm (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 20 dpa..... 89
- Abb. 38: Anteile des N in den Proteinfractionen an der Endosperm-TM (Haupttrieb) für die Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch..... 91
- Abb. 39: Vergleich der Versuche 2009 und 2010 hinsichtlich der Anteile des N in den Proteinfractionen an der Endosperm-TM (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 20 dpa 91
- Abb. 40: Prozentualer Anteil der Proteinfraction an der Summe des extrahierten N aller drei Proteinfractionen des Endosperms (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch..... 94
- Abb. 41: Vergleich der prozentualen Anteile der Proteinfraction an der Summe des extrahierten N aller drei Proteinfractionen aus den Versuchen 2009 und 2010 für den Zeitpunkt 20 dpa 94
- Abb. 42: ^{15}N -Überschuss der Proteinfractionen des Endosperms (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch..... 96

Abb. 43: Vergleich der Versuche 2009 und 2010 hinsichtlich des ^{15}N -Überschusses der Proteinfractionen des Endosperms (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 20 dpa	97
Abb. 44: Massenanteile des ^{15}N in den Proteinfractionen an der Trockenmasse des Endosperms (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch	98
Abb. 45: Vergleich der Versuche 2009 und 2010 hinsichtlich der Massenanteile des ^{15}N in den Proteinfractionen an der Trockenmasse des Endosperms (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 20 dpa.....	99
Abb. 46: Prozentualer Anteil der Proteinfraction an der Summe des extrahierten ^{15}N aller drei Proteinfractionen des Endosperms (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch	101
Abb. 47: Vergleich der prozentualen Anteile der Proteinfraction an der Summe des extrahierten ^{15}N aller drei Proteinfractionen aus den Versuchen 2009 und 2010 für den Zeitpunkt 20 dpa	101
Abb. 48: Trockenmassen der Ähren aller Bestockungstriebe von Pflanzen der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 aus dem ersten Hauptversuch 2009	109
Abb. 49: Regressionsmodell für die Abhängigkeit der Stickstoffmenge im Endosperm von der Trockenmasse	127

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Wichtigste Charakteristiken einiger Vertreter der Kohlenstoff- und Stickstoff-Isotopenfamilien (nach [20])	28
Tab. 2: Übersicht über die Dauer der vegetativen Phase (Auflaufen – Anthese) sowie der Umweltbedingungen im Zeitraum von der Anthese bis zur Probenahme für die Versuchsjahre 2009 und 2010 (20 dpa)	40
Tab. 3: Extraktionsprotokoll zur sequentiellen Fraktionierung von Lipiden, Albuminen und Globulinen, Hordeinen und Glutelinen aus Endospermen von <i>Hordeum vulgare</i> L.	47
Tab. 4: Mittlere C-Mengen und C-Trockenmasseanteile in den Blättern des Haupttriebes der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 im zweiten Hauptversuch.....	60
Tab. 5: Mittlerer ^{13}C -Überschuss und ^{13}C -Trockenmasseanteil in den Blättern des Haupttriebes 2009 und 2010 der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13	64
Tab. 6: Mittlere N-Menge und N-Massenanteil in den Blättern des Haupttriebes 2009 und 2010 der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13	68
Tab. 7: Mittlerer ^{15}N -Überschuss und ^{15}N -Trockenmasseanteil in den Blättern des Haupttriebes 2009 und 2010 der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 20 dpa	72
Tab. 8: Mittlere N-Menge und N-Massenanteil in den Endospermen des Haupttriebes 2009 und 2010 der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 20 dpa	81
Tab. 9: Mittlerer ^{15}N -Überschuss und ^{15}N -Massenanteil in den Endospermen des Haupttriebes 2009 und 2010 der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 20 dpa	84
Tab. 10: Rohnährstoffgehalte im reifen Korn (2009) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13	86
Tab. 11: Gesamt-extrahierter proteinogener Stickstoff pro Endosperm für die Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 in den Versuchsjahren 2009 (14 und 20 dpa) und 2010 (20 dpa)	95

Tab. 12: Gesamt-extrahierter proteinogener ^{15}N pro Endosperm für die Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 in den Versuchsjahren 2009 (14 und 20 dpa) und 2010 (20 dpa).....	102
Tab. 13: Reinheit der Proteinfractionen Albumine/Globuline, Hordeine und Gluteline für die Versuchsjahre 2009 (14, 20 dpa) und 2010 (20 dpa).....	103
Tab. 14: N-Wiederfindung in der Summe der extrahierten Fraktionen pro Endosperm gegenüber der N-Menge pro Endosperm (100 %) für die Versuchsjahre 2009 (14, 20 dpa) und 2010 (20 dpa).....	104
Tab. 15: ^{13}C - und ^{15}N Anreicherung in Sprossachse, Blättern und Endosperm (Haupttrieb, 2009) markierter bzw. unmarkierter Pflanzen der Genotypen 'Bomi', Risø 16 sowie Risø 13.....	105
Tab. 16: Mittlere Anzahl an Bestockungstrieben pro Pflanze aus den Versuchen 2009 (8, 14, 20 dpa) und 2010 (20 dpa) für die Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13.....	107
Tab. 17: Mittlere Trockenmassen der Organe der Bestockungstriebe von Pflanzen der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 aus 2009 für die Zeitpunkte 8, 14 und 20 dpa.....	108
Tab. 18: Mittlere Trockenmassen der Organe der Bestockungstriebe von Pflanzen der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 aus den Versuchsjahren 2009 und 2010 zum Zeitpunkt 20 dpa	110
Tab. 19: Kalkulation des ^{13}C -Überschusses im Endosperm und der Anteile der Organe an der Summe des ^{13}C -Überschusses aller analysierten Organe für die Genotypen 'Bomi', Risø 16 sowie Risø 13 aus den Versuchen 2009 und 2010	122
Tab. 20: Korrelationskoeffizienten nach Pearson (R) für die Korrelation der N-Mengen im Endosperm mit jenen in den Sprossachsen, Blättern bzw. vegetativen Organen (Summe Sprossachse & Blätter) der Genotypen 'Bomi' sowie Risø 16 aus dem ersten Hauptversuch (8, 14 und 20 dpa)	128
Tab. 21: Mittlere Änderung der N-Menge in den vegetativen Organen (Blätter und Sprossachse) sowie in den Endospermen einer Ähre innerhalb der Zeiträume 8 - 14 dpa, 14 - 20 dpa und 8 - 20 dpa (2009).....	130
Tab. 22: Mittlerer ^{15}N -Überschuss in den vegetativen Organen (Blätter & Sprossachse) und Endospermen der Ähre des Haupttriebes aus dem ersten Hauptversuch sowie Anteile der Endosperme an der Summe der ^{15}N -Überschusswerte in den analysierten Organen	135

Tab. 23: Gegenüberstellung der Mittelwerte der prozentualen Anteile der Proteinfractionen am gesamt-extrahierten N und ^{15}N für die Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 14 und 20 dpa im ersten Hauptversuch....146

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AG	Albumin/Globulin (Proteinfraction)
AGPase	ADP-Glucose-Pyrophosphorylase
BBCH	Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpa	days post anthesis (Tage nach Anthese)
dt	Dezitonne (100kg)
EMS	Ethylmethansulfonat
GLU	Glutelin (Proteinfraction)
GPC	grain protein content (Korn-Protein-Gehalt)
ha	Hektar (10.000 m ²)
HOR	Hordein (Proteinfraction)
Mt	Megatonne (1.000.000 t)
NfE	Stickstofffreie Extraktstoffe
NPN	Nicht-Protein-Stickstoff
PPCO	Polypropylen-Copolymer
RA	Rohasche
RF	Rohfett
RFA	Rohfaseranteil
RP	Rohprotein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	standard error (Standardfehler)
UDP	Uridindiphosphat
v/v	volume/volume (Mischungsverhältnis: Volumen zu Volumen)
w/v	weight/volume (Mischungsverhältnis: Masse zu Volumen)

1 Einleitung

1.1 Gerste (*Hordeum vulgare* L.)

1.1.1 Herkunft und Bedeutung

Gerste zählt zu den ältesten Kulturpflanzen der Menschheit. Bereits seit dem siebenten möglicherweise sogar seit dem achten Jahrtausend vor Christus existierten im vorderen Orient einfache bäuerliche Wirtschaftsformen mit Anbau von Weizen und Gerste. Dieses Gebiet überschneidet sich mit dem natürlichen Verbreitungsgebiet der Wildformen dieser beiden Arten, *Triticum boeoticum* (Wild Einkorn), *Triticum dicoccoides* (Wild Emmer) und *Hordeum vulgare* ssp. *L. spontaneum* (C. Koch) Thell. (Wild Gerste). Auch in der ältesten bekannten urbanen Siedlung, Mehrgarh am Rand des Schwemmlandes des Indus, lebten vor 8000 Jahren Menschen vom Anbau von Weizen, Gerste und Datteln. Vom Nahen Osten aus erfolgte im Zuge der sogenannten „Vorderasiatischen Kulturdrift“ die Ausbreitung des Ackerbaus über den Balkan und den Mittelmeerraum bis nach Mitteleuropa, wo erste bäuerliche Siedlungen vor etwa 5000 Jahren entstanden. [1]

Die weltweite Anbaufläche von Gerste betrug 2008 ca. 56,5 Mio. ha und die Produktion 155 Mt. Damit lag Gerste hinsichtlich der Produktion 2008 nach Mais (826 Mt), Reis (686 Mt) und Weizen (683 Mt) auf Platz vier der wichtigsten Getreidearten. Die größten Erzeugerländer sind die Russische Föderation, die Ukraine, Frankreich, Deutschland, Spanien und Australien [8]. In Deutschland wurden in den Jahren 2004 bis 2009 im Mittel 11,9 Mio. Tonnen Gerste produziert, davon 2,6 Mio. t Sommergerste und 9,3 Mio. t Wintergerste. Die mittleren Erträge pro Hektar lagen in den Jahren 2003 bis 2008 bei 47,9 dt für Sommer- und 62,8 dt für Wintergerste. Die meistangebauten Sommergerstensorten in Deutschland waren 2009 'Marte', 'Braemar', 'Quench' und 'Belana'. Bei Wintergerste hatten 'Lomerit', 'Fridericus', 'Campanile' und 'Noamie' den größten Anteil an der Anbaufläche [9].

Gerste hat sich neben Reis als eine Modellpflanze für Getreide etabliert. Die große wirtschaftliche Bedeutung, das weltweite Vorkommen, ihre große ökologische Amplitude, die kurze Vegetationsdauer und die zeitig abreifenden

Körner prädestinieren sie hierfür [12]. Aufgrund der genannten Eigenschaften und des mit 5,4 Milliarden Basenpaaren relativ kleinen Genoms wird seit 2007 an dessen Entschlüsselung gearbeitet. Damit werden sich Möglichkeiten ergeben, mittels gentechnischer Methoden Ertrags- und Qualitätsparameter oder Resistenzen gegenüber Krankheitserregern gezielt zu manipulieren bzw. zu erzeugen, woran ein großes wirtschaftliches Interesse besteht [39].

1.1.2 Umweltansprüche

Der Anbau von Gerste erfolgt weltweit zwischen dem 50. südlichen- und dem 65. nördlichen Breitengrad, vom Meerespiegel bis in Höhenlagen, beispielsweise in Tibet, von 4150 m [10, 13]. In tropischen Gebieten kommt sie jedoch selten vor, da sie nicht für feuchtwarme Klimate geeignet ist [134]. Durch ihre kurze Vegetationsdauer und die relative Anspruchslosigkeit an die Bodenbedingungen ist Gerste in besonderem Maß für extreme Anbaulagen wie kühle subarktische Gebiete in Nordeuropa oder heiße Gebiete (z. B. Naher Osten) geeignet [15]. Gerste ist die salztoleranteste Getreidespezies. Konduktivitätswerte (σ) von Böden von über $800 \text{ mS} \cdot \text{m}^{-1}$ führen jedoch zu Ertragseinbußen [14]. Dies macht sie zu einer wichtigen Nutzpflanze, da die Versalzung von Böden ein wachsendes Problem darstellt, besonders in Gebieten, in welchen man auf künstliche Bewässerung angewiesen ist. Optimale Erträge werden auf lockeren Böden, bei guter Wasser- und Stickstoffversorgung sowie kühlen bis moderaten Temperaturen erzielt [14, 17]. Hinsichtlich des Stickstoffgehaltes ist das Optimum nach der Nutzung des Produktes und dem Ertrag zu differenzieren, da eine gute Stickstoffversorgung zu höheren Proteingehalten führt, was bei Braugerste unerwünscht ist. Zu niedrige Stickstoffgehalte führen allerdings zu Ertragseinbußen [14]. Die Optimumtemperatur ist je nach Entwicklungsstadium verschieden, sie liegt für die Kornfüllungsphase beispielsweise bei zwischen 14 und 18 °C [17]. Sehr hohe Temperaturen ($> 35 \text{ °C}$) im Zeitraum nach der Anthese können zu verringerten Erträgen führen [16]. Saure, verdichtete und wasserstauende Böden sind für den Anbau von Gerste nicht geeignet [14].

1.1.3 Klassifizierung

Die Einteilung von Gerstensorten erfolgt hinsichtlich verschiedener Kriterien. Bezüglich der kommerziellen Nutzung wird nach Futter- und Braugerste unterschieden. Erstere dient der Ernährung von Nutztieren. Ihr Anteil liegt bei ca. 85 % der weltweiten Produktion [10]. Braugerste wird zur Herstellung von Malz verwendet. Dieses findet Einsatz bei der Herstellung von Bier, Whiskey und als Inhaltsstoff von Lebensmitteln, vor allem Backwaren [12]. Braugersensorten zeichnen sich durch einen geringeren Proteingehalt als Futtergerste aus, welcher durch die genetische Ausstattung der Sorte und die Anbaumaßnahmen beeinflusst wird [12, 128]. Ein weiteres wichtiges Selektionsmerkmal bei der Züchtung von Braugersten ist synchrone Keimung, da diese bei der Malzherstellung von entscheidender Bedeutung ist [10]. In einigen Ländern wie China, Indien oder Marokko wird Gerste auch in stärkerem Ausmaß zu Mehl oder Graupen verarbeitet und direkt als Fladenbrot oder Porridge konsumiert [10, 12]. Hinsichtlich der Anbauform unterscheidet man Winter- und Sommergerste. Wintergerste wird im Herbst (September) ausgesät und bildet noch vor dem Winter Bestockungstriebe. Sie bedarf eines Kältestimulus zur Induktion der Bildung der Blütenorgane (Vernalisation) [12]. Die Aussaat der Sommergerste erfolgt im Frühjahr (März/April). Sie hat eine geringere Vegetationsdauer und ein geringeres Wärmebedürfnis als Wintergerste, liefert jedoch in der Regel geringere Erträge [129]. Ein weiteres Ordnungsmerkmal ist die Form der Ähre. Man unterscheidet zwei-, vier- und sechszeilige Gerste. Bei zweizeiliger Gerste ist nur eine der drei Blüten eines Ährchens fertil, bei vier- und sechszeiligen Sorten sind es alle Blüten. Wenn die Glieder der Ährenspindel lang sind, schachteln sich die Seitenblüten der gegenüberstehenden Ährchen ineinander, so dass sich 4 Zeilen ergeben. Bei sechszeiligen Sorten sind die Spindelglieder kurz wodurch sich die Seitenblüten nicht ineinander schachteln können und sechs Reihen entstehen [11]. Gerstensorten werden weiterhin in Nackt- und Spelzgerste unterteilt. Bei ersterer lösen sich die Körner während des Dreschvorgangs von den Spelzen, währen bei Spelzgersten die Vor- und Deckspelze fest an der Karyopse anhaften [73].

1.1.4 Taxonomie und Morphologie

Die heute im Ackerbau eingesetzten Gerstensorten gehören zur Art *Hordeum vulgare* L. ssp. *vulgare*. Diese ist ein Vertreter der Familie der Poaceae (Süßgräser), welche taxonomisch in der Ordnung der Poales aus der monophyletischen Gruppe der Monocots eingeordnet wird [2]. Gerste ist eine einkeimblättrige, einjährige Pflanze von ca. 60 bis 120 cm Höhe. Sie bildet zwei Wurzelsysteme. Ein Keimwurzelsystem, welches sich aus der Radikula entwickelt und ein Adventivwurzelsystem. Die Wurzeln, welche in tiefe Bodenschichten vordringen gehören meist zum Keimwurzelsystem, während das Adventivwurzelsystem den Bereich nahe der Bodenoberfläche durchdringt [73]. Die Halme sind aufrecht und bestehen aus hohlen, zylindrischen Internodien, unterteilt von Internodien, welche die Blätter tragen [5]. Aus dem Hypokotyl des Keimlings entwickelt sich zunächst ein zentraler Trieb, dessen Sprosssteil kurz über der Bodenoberfläche später anschwillt und die sogenannte Krone bildet. An dieser entspringen zu einem späteren Zeitpunkt Adventivwurzeln und in der Regel zwei bis fünf Bestockungstriebe [73]. Die Blätter sind linealisch, parallelnervig, fünf bis zwanzig Millimeter breit und sitzen zweizeilig am Halm. Sie bestehen aus einer Blattspreite und einer Blattscheide, welche den Stängel vollständig umschließt. Am Übergang zwischen beiden befinden sich die Blattöhrchen (Auricula) und das Blatthäutchen (Ligula), die im Unterschied zu denen anderer Getreidearten weich sind, den Stängel vollständig umschließen und mitunter durch Anthocyane gefärbt sind. Die Infloreszenz ist eine Ähre mit einer zähen, zur Reife nicht brüchigen Ährenspindel (Rachis) an der alternierend Ährchen aus drei Blüten sitzen. Die Achse der Ährchen trägt im unteren Teil zwei Hochblätter (Bracteen). Darüber entspringen jeweils aus der Achsel einer meist begrannnten Deckspelze die kleinen Blütenprossse, welche ein Vorblatt (Vorspelze), zwei Schwellkörper (Lodiculae), das Androezeum und das Gynoezeum tragen. Das Androezeum besteht aus drei Staubgefäßen, das Gynoezeum aus einem einblättrigen, oberständigen, einfächrigen Fruchtknoten mit zwei fiedrig verzweigten Narben. Gerste ist kleistogam, d. h. die einzelnen Blüten befruchten sich selbst. Die Frucht ist eine Schließfrucht, Karyopse genannt, bei der die Fruchtwand (Perikarp) fest mit der Samenschale (Testa) verwachsen ist. [3, 4]

1.1.5 Das Endosperm der Gerste

Bei der Befruchtung verschmilzt eine haploide Spermazelle aus dem Pollenkorn mit der ebenfalls haploiden Eizelle im Embryosack. Aus der diploiden Zygote entsteht durch Mitosen der Embryo. Die zweite Spermazelle des Pollenkorns verschmilzt mit den zwei Polkernen des Embryosacks, wodurch ein triploider sekundärer Embryosackkern entsteht, aus welchem sich durch mitotische Teilungen das Endosperm entwickelt. Man bezeichnet dies als doppelte Befruchtung. Der Samen setzt sich aufgrund der vorangegangenen doppelten Befruchtung aus einem diploiden Embryo und einem triploiden Endosperm zusammen. Der Embryo besteht aus der Keimwurzel und der Sprossanlage mit der Stammknospe und den ersten Blattanlagen. Das zweite Keimblatt des Embryos ist zum Scutellum und zur Keimscheide (Koleoptile) umgebildet, welche als Schutzorgan für das austreibende Keimblatt dient. [4, 7] Das Scutellum liegt zwischen dem Embryo und dem Endosperm und spielt eine bedeutende Rolle für den Stofftransport zwischen beiden Organen sowie für die Hormonsynthese während des Keimvorgangs [6]. Das Endosperm wird auch als Mehlkörper bezeichnet. Zur Reife besteht das Endosperm aus dem zentralen Stärkeendosperm (Mehlkörper), der Sub-Aleuronschicht, der Aleuronschicht, der basalen Endosperm-Transferschicht und der Embryo-umgebenden Region (Abb. 1) [72]. Das Endosperm versorgt den Embryo während der Keimung mit Energie und den notwendigen Nährstoffen für sein initiales Wachstum, bis er in der Lage ist, sich mittels Photosynthese und Nährstoffaufnahme über die Wurzel selbständig zu ernähren. In diesem Stadium wird vom Embryo (inkl. Scutellum) Gibberelinsäure in das Endosperm abgegeben, wo sie in die Aleuronschicht wandert. Dort induziert sie die Synthese von Hydrolasen (α -Amylase), Phosphorylasen, Lipidasen, Nucleasen und Proteasen. Teilweise werden Enzyme auch direkt vom Scutellum in das Endosperm abgegeben (β -Amylase). Die neu synthetisierten und bereits vorhandenen, aktivierten Enzyme dringen anschließend in den Mehlkörper ein und sorgen für den Abbau der Reservestoffe. Die Spaltprodukte, welche über das Scutellum in den Embryo gelangen ermöglichen dessen Wachstum bis er in der Lage ist, sich selbst zu ernähren. [6, 7]

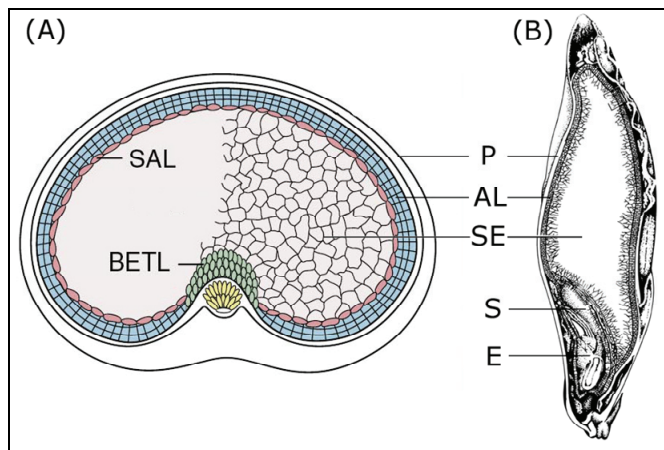


Abb. 1: Schematischer Querschnitt (A, aus [72]) und Längsschnitt (B, aus Kapitel 2 in [42]) durch eine Gerstenkaryopse (P –Perikarp, AL – Aleuronschicht, SAL – Sub-Aleuronschicht, SE – zentrales Stärkeendosperm, BETL – basale Endosperm Transferschicht, S – Scutellum, E – Embryo)

Die Entwicklung des Endosperms lässt sich in zwei Phasen unterteilen. In der ersten Phase, welche bis 20 Tage nach der Anthese (dpa) dauert, finden schnelle Zellteilungen der Zygote und des triploiden Nukleus statt. Anschließend erfolgt die Ausdehnung der Zellen, welche durch den Einfluss von Wasser bewirkt wird. In der zweiten Phase findet die Kornfüllung, d. h. die Einlagerung der Speicherstoffe statt. Sie beginnt etwa 10 dpa und endet mit der Reife des Kornes. [40, 41]

1.1.6 Inhaltstoffe im Gerstenkorn

Zur Reife beträgt das Tausendkorngewicht (TKW) zweizeiliger Gersten etwa 46 g [42]. Der Anteil des Endosperms am reifen Gesamtkorn liegt bei etwa 80 %. Wie auch die Anteile der Inhaltstoffe unterliegen diese Parameter jedoch relativ großen Schwankungen in Abhängigkeit von Genotyp, Anbaubedingungen (Aussaattermin, Düngung etc.) sowie den Umweltbedingungen wie z. B. dem Temperaturverlauf und der Wasserversorgung während der vegetativen und generativen Wachstumsphase [42, 43]. Das Gerstenkorn setzt sich im Reifestadium bei wirtschaftlich genutzten, zweizeiligen Spelzgerstenkultivaren aus folgenden Fraktionen zusammen: 45 - 75 % Stärke, 7 - 14 % Rohprotein, 20 - 25 % unlösliche Polysaccharide (Zellwandbestandteile incl. Lignin), 2 - 3 % Lipide, 2 - 3 % Einfachzucker und Oligosacchariden sowie 2 - 3 % Mineralien (Asche) [43, 42, 44, 45, 46].

1.1.6.1 Die Stärkefraktion

Stärke setzt sich aus den Bestandteilen Amylose und Amylopektin zusammen. Erstere ist ein weitgehend unverzweigtes Molekül aus α -(1,4)-D-Glucose, während letztere zusätzlich über α -(1,6)-glykosidische Bindung verknüpfte Seitenketten besitzt. Im Normalfall beträgt das Amylopektin- zu Amylose-Verhältnis 3 : 1. Durch gentechnische Veränderung wurden jedoch auch Mutanten erzeugt, welche bis zu 100 % Amylopektin enthalten und die als *waxy-type* bezeichnet werden. Im Endosperm kommt Stärke in Form von Stärkekörnchen vor, die nach ihrer Größe in Typ A (15 - 25 μm) und Typ B (< 10 μm) unterteilt werden. [42]

Für *H. vulgare* L. cv. 'Bomi' wurde berichtet, dass die Stärkesynthese ca. 5 dpa beginnt und etwa zu 42 dpa abgeschlossen ist. Zwischen 16 und 22 dpa wurde die maximale Syntheserate beobachtet [47]. Untersuchungen zur Samenentwicklung bei der Sorte 'Barke' ergaben, dass die Stärkeeinlagerung im Endosperm zum Zeitpunkt 8 - 9 dpa beginnt und bereits 17 - 18 dpa abgeschlossen ist [48]. Der Grundbaustein der Stärke, Glucose, wird in Form von Saccharose durch die Mutterpflanze bereitgestellt. Der darin enthaltene Kohlenstoff stammt wahrscheinlich zum größten Teil aus der aktuellen Photosynthese der Pflanze [49]. Gelangt die Saccharose in das Zytosol der Endospermzellen, erfolgt die Spaltung durch das Enzym Saccharasesynthase in UDP-Glucose und Fructose oder in geringem Ausmaß durch Invertasen in Glucose und Fructose. UDP-Glucose wird durch UDP-Glucose-Pyrophosphorylase in Glucose-1-Phosphat umgewandelt. Die entstandenen Hexosen werden durch Hexokinasen, Phosphoglucoisomerase und/oder Phosphoglucomutase in Glucose-1-Phosphat oder Glucose-6-Phosphat umgewandelt. Glucose-1-Phosphat ist das Substrat des Enzyms ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase), welches daraus ADP-Glucose erzeugt, die wiederum das Substrat der Stärkesynthese ist [50]. Im Endosperm monokotyler Pflanzen existieren zwei Isoformen der AGPase, eine zytosolische und eine plastidäre Form, wobei erstere, zumindest bei Mais, 85 - 90 % zur Gesamtaktivität beitragen soll [51, 52]. Stärkesynthase, das stärkeverzweigende- und stärkeentzweigende Enzym sind für die Synthese der Endprodukte Amylose und Amylopektin verantwortlich und im Amyloplasten lokalisiert. Das Substrat der Stärkesynthase

wird demnach wahrscheinlich zu einem Großteil im Zytosol synthetisiert und gelangt über einen ADP-Glucose Transporter in das Endosperm. In geringerem Ausmaß werden die im Zytosol bei der Saccharosespaltung entstehenden Hexosephosphate über einen Hexosephosphat-Translokator in den Amyloplasten befördert und durch die zytosolische Form der AGPase in ADP-Glucose umgewandelt [50]. Die zuvor beschriebenen Vorgänge sind in Abb. 2, einem Schema von EMES et al. (2002) zusammengefasst [40].

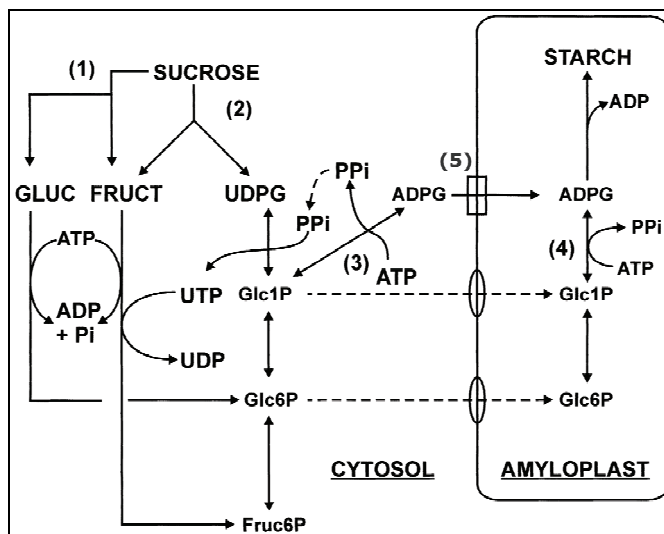


Abb. 2: Schema der Stoffwechselwege zur Stärkesynthese im Zytosol und Amyloplasten des Endosperms (aus [40]). (1 – Invertase, 2 – Saccharose-Synthase, 3 – zytosolische AGPase, 4 – plastidische AGPase, 5 – ADP-Glucose-Transporter)

1.1.6.2 Die Proteinfraktion

Wie zuvor bereits erwähnt, beträgt der Rohproteingehalt im reifen Gerstenkorn meist zwischen 7 und 14 % [43, 42, 44, 45, 46]. Davon entfallen etwa 80 - 85 % auf Proteine und 15 - 20 % auf Nicht-Protein-Stickstoff (NPN) [73]. Dieser umfasst stickstoffhaltige Moleküle, welche bei der Gesamt-Stickstoffbestimmung miterfasst werden wie z. B. Polypeptide, freie Aminosäuren, Vitamine und DNA. Die Proteine im eigentlichen Sinn werden bei Getreide klassisch nach ihrer Löslichkeit in einer Sequenz von Lösungsmitteln in Albumine (Wasser), Globuline (Salzlösung), Prolamine (70%iges Ethanol) und Gluteline (Alkalische Lösung) eingeteilt [53]. Die Prolamine der Gerste werden Hordeine genannt. Die Extraktionsprotokolle wurden im Laufe der Zeit jedoch

mehrfach optimiert und angepasst, was besonders die Puffer und Extraktionsbedingungen zur Hordein- und Globulinextraktion betrifft. Meist werden Albumine und Globuline zusammen extrahiert und als salzlösliche Fraktion bezeichnet. Zunehmend erfolgt die Einteilung von Proteinen nach ihrer Funktion, da die Osborne-Fraktionen von heterogener Zusammensetzung sind. Man unterscheidet Speicherproteine und Nicht-Speicherproteine. Speicherproteine umfassen den Großteil der Hordeine sowie einen Teil der Gluteline und Globuline [54]. Strukturanalysen ergaben, dass ein Teil der Glutelinfraktion aufgrund hoher Struktur analogien der Proteine zu Hordeinen, trotz unterschiedlicher Löslichkeit, der Prolaminfraktion zuzurechnen ist [55]. Nichtspeicherproteine enthalten Strukturproteine und solche mit metabolischer Funktion (z. B. Enzyme) und sind hauptsächlich in der Albumin- und Globulinfraktion enthalten. Die Bildung der salzlöslichen Proteine, der Albumine und Globuline, erfolgt hauptsächlich im Zeitraum von 10 dpa (15 % finale Endosperm-TM) bis 34 dpa (65 % finale Endosperm-TM) [37]. Hordeine konnten etwa ab ca. 18 dpa nachgewiesen werden, als die Kornmasse rund 33 % des Wertes zur Reife betrug [57]. Im Anschluss stieg der Gehalt sehr steil an. Die Synthese der Gluteline beginnt ca. 10 dpa und dauert wie jene der Hordeine bis zur Reife an [37]. Die Anteile der Fraktionen am Gesamtprotein im reifen Korn betragen ca. 9 - 15 [% N_{Total}] für Albumine und Globuline, 38 - 58 [% N_{Total}] für Hordeine und 25 - 28 [% N_{Total}] für die Gluteline [58, 59].

Der Beitrag der einzelnen Fraktionen zum Gesamtprotein ist von Faktoren wie Genotyp, Umwelt- und Anbaubedingungen abhängig. So konnte in einer Untersuchung von WANG et al. (2007) gezeigt werden, dass eine höhere N-Düngung den Gehalt aller Fraktionen erhöhte, die Verteilung der einzelnen Fraktionen jedoch nach Genotyp variierte. Für die Albuminfraktion wurde eine Abhängigkeit vom Aussaattermin und dem N-Applikationszeitpunkt nachgewiesen, jedoch nur eine geringe von der Höhe der Stickstoffgabe. Die Globuline verhielten sich entgegengesetzt zu Albuminen und die Speicherproteine (Hordeine und Gluteline) reagierten sensitiv auf Aussaattermin und Stickstoffgabe, jedoch weniger auf den Zeitpunkt der N-Applikation [60]. Genauere Untersuchungen der Hordeinfraktion, die aufgrund ihres großen Beitrages zum Gesamtprotein von besonderer Bedeutung ist, ergaben, dass sich die relative

Zusammensetzung der Polypeptide (bzw. der mittels SDS-Page auftrennbaren Unterfraktionen, B-, C-, D-Hordein) zum einen während der Kornentwicklung und zum anderen in Abhängigkeit der Nährstoffverfügbarkeit (N, S) und der *Source-Sink*-Balance verändert [61, 56, 58]. Die genauen Mechanismen der Proteinakkumulation im Korn sind bis heute nicht eindeutig geklärt.

Der für die Proteinsynthese notwendige Stickstoff wird von der Mutterpflanze während der Kornentwicklung bereitgestellt und gelangt über deren Phloem zum Korn. Er stammt einerseits aus der aktuellen N-Assimilation der Wurzeln, zum Anderen wird er in seneszenten Organen der Pflanze remobilisiert, vor allem in den alternden Blättern im Zuge der Degradation des Photosynthesapparates in den Chloroplasten. Der während der Kornentwicklung assimilierte Stickstoff, welcher im Xylem transportiert wird, muss an bestimmten Stellen auf dem Weg zum Korn in das Phloem gelangen. Nach einer Untersuchung von MATTSON et al. (1993) ist es wahrscheinlich, dass dieser Stickstoff relativ gerichtet ins Korn transportiert wird und sich bei dieser Umverlagerung nicht mit dem in den oberirdischen Organen vorhandenen Stickstoff über den Proteinpool vermischt [64], wie es von anderen Autoren vorgeschlagen wurde [63, 65]. Beim Transport von Stickstoff in das sich entwickelnde Korn dürfte, nach Studien an Weizen, Glutamin die größte Bedeutung zukommen [66] und SHEWRY et al. (2001) vermutet eine steuernde Rolle dieser Aminosäure bei der Regulation des Expressionslevels von Speicherproteinen in Abhängigkeit von der Stickstoffverfügbarkeit [67]. Es existieren zahlreiche Untersuchungen zum Beitrag von remobilisiertem und nach der Anthese assimiliertem Stickstoff für die Proteineinlagerung im Korn. EGELE et al. (2008) fand bei optimal stickstoffversorgten Gerstenpflanzen ein Verhältnis von ca. 3 : 1 für remobilisiertem zu aktuell assimiliertem Stickstoff in der Ähre und ein nahezu gleichen Beitrag von Stickstoff beider Herkünfte in Pflanzen, welche im Zeitraum vor der Anthese wenig Stickstoff zur Verfügung hatten [68]. Auch andere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass der Beitrag der Remobilisierung zum N-Gehalt im Korn bei Getreide mit 50 – 70 % sehr hoch ist [69, 70, 71]. LEMÂÎTRE et al. (2008) zeigte durch Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana* jedoch eine entgegengesetzte Auswirkung der Stickstoffversorgung auf die Remobilisierungs-

rate, welche sich bei fünffach niedriger Stickstoffgabe nahezu verdoppelte [125].

1.2 Stabile Isotope

Als Isotope bezeichnet man Atome eines Elements mit unterschiedlicher Neutronenzahl (bzw. Massenzahl), aber gleicher Protonenzahl (bzw. Ordnungszahl) [18]. Neben der Masse unterscheiden sich Isotope im Kernvolumen, in der Spinquantenzahl und der magnetischen Quantenzahl des Atomkerns [19]. Nur zwanzig der natürlich vorkommenden Elemente sind sogenannte Reinelemente oder anisotope Elemente, also Elemente von denen nur ein Isotop existiert (z. B. Na, Al, I). Die Mehrzahl der Elemente sind Mischelemente, zusammengesetzt aus mindestens zwei isotopen Nukliden (Atomarten), die mit verschiedenen Häufigkeiten enthalten sind [18]. Die Zahl der Isotope eines Elements wird durch die Astonsche Isotopenregel bestimmt, welche besagt, dass Elemente mit ungerader Ordnungszahl höchstens zwei stabile Isotope haben, während solche mit gerader Ordnungszahl wesentlich mehr als zwei Isotope haben können. Es werden stabile- und instabile Isotope unterschieden. Instabile Isotope sind radioaktiv, das heißt sie zerfallen nach einer bestimmten Zeit unter Abgabe von Energie (α -, β - und/oder γ -Strahlung) in andere Nuklide [20]. Die Lebensdauer eines Radionuklids wird mit Hilfe der sog. Halbwertszeit $T_{1/2}$ angegeben. Diese entspricht der Zeitspanne, in welcher die Hälfte der vorhandenen Atomkerne in einem bestimmten System zerfällt [21].

In der vorliegenden Arbeit wurde mit den stabilen Isotopen ^{13}C und ^{15}N gearbeitet. Eine Auswahl der Charakteristika von Vertretern der Kohlenstoff- und Stickstoff-Isotopenfamilien ist in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: Wichtigste Charakteristiken einiger Vertreter der Kohlenstoff- und Stickstoff-Isotopenfamilien (nach [20]). $T_{1/2}$ ist die Halbwertszeit und Isotope ohne Angabe einer Halbwertszeit sind stabile Isotope. Die natürliche relative Häufigkeit der Isotope basiert auf der weltweit vorhandene Menge des Elements.

Kohlenstoff Isotope						
Bezeichnung	^{10}C	^{11}C	^{12}C	^{13}C	^{14}C	^{15}C
Häufigkeit	---	---	98,90 %	1,10 %	---	---
$T_{1/2}$	19,3 s	20,3 min	---	---	5715 a	2,45 s
Stickstoff Isotope						
Bezeichnung	^{12}N	^{13}N	^{14}N	^{15}N	^{16}N	^{17}N
Häufigkeit	---	---	99,60 %	0,37 %	---	---
$T_{1/2}$	0,1 s	10,05 min	---	---	---	---

Die Angabe der Isotopenhäufigkeit kann auf verschiedene Arten erfolgen. Die natürliche Häufigkeit, wird in der Regel als prozentualer Anteil des betrachteten Isotops von der Gesamtheit der stabilen Isotope eines Elements weltweit oder in einem anderen definierten Pool ausgedrückt. Sie berechnet sich z. B. für ^{13}C in einem Pool wie folgt:

$$\text{Atom-}\%^{13}\text{C} = \frac{^{13}\text{C}}{^{13}\text{C} + ^{12}\text{C}} * 100 \quad 1.1$$

Für ^{13}C beträgt die natürliche Häufigkeit (global) 1,1 %, für ^{12}C hingegen 98,9 % [20]. Bei atmosphärischem Stickstoff beträgt sie für ^{14}N 99,6337 % und für ^{15}N 0,3663 % [24]. Bei Messungen von Isotopen, z. B. mittels Massenspektroskopie wird das Molverhältnis R des schweren und leichten Isotops bestimmt:

$$R = \frac{\text{schweres Isotop}}{\text{leichtes Isotop}}, \text{ z. B.: } R = \frac{{}^{15}\text{N}}{{}^{14}\text{N}} \quad 1.2$$

Da die Abweichungen der Messwerte von der natürlichen Häufigkeit im Allgemeinen äußerst gering sind, erfolgt die Angabe der Konzentration des seltenen Isotops üblicherweise als Delta-Wert (δ -Wert), welcher in Promille (‰) Überschuss des Isotops über einem internationalen Standard angegeben wird [26]:

$$\delta^{15}\text{N}(\text{‰}) = \frac{R_{\text{Probe}} - R_{\text{Standard}}}{R_{\text{Standard}}} * 1000 \quad 1.3$$

Für ${}^{13}\text{C}$ wurde in der Vergangenheit PDB (Pee Dee Belemnite), ein fossiles Sediment aus der Kreidezeit, in South Carolina (USA) mit erhöhtem ${}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$ -Verhältnis ($R = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C} = 0,0111802$) verwendet. Da dieses jedoch seit langer Zeit aufgebraucht ist, werden Sekundärstandards verwendet, welche gegen den Primärstandard geeicht wurden [22]. Der Standard für ${}^{15}\text{N}$ ist atmosphärischer Stickstoff ($R = {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N} = 0,0036765$, [27]).

Eine weitere Möglichkeit, die Isotopenhäufigkeit anzugeben, besteht in der Berechnung der Häufigkeit über einem Basisniveau, dem sogenannten APE-Wert. Diese Angabe findet z. B. bei Tracerversuchen Anwendung, wo mit den APE-Werten u. a. verschiedene Kompartimente verglichen werden können, die sich hinsichtlich der natürlichen Häufigkeit des Isotops aufgrund von Fraktionierung (Basisniveau) unterscheiden. Die Formel zur Berechnung am Beispiel ${}^{13}\text{C}$ lautet [28]:

$$\text{Atom-}\text{‰}^{13}\text{C}_{\text{excess}} = \left(\frac{{}^{13}\text{C}}{{}^{13}\text{C} + {}^{12}\text{C}} \right)_{\text{Markiert}} - \left(\frac{{}^{13}\text{C}}{{}^{13}\text{C} + {}^{12}\text{C}} \right)_{\text{Basis}} * 100 \quad 1.4$$

$$\text{Atom-}\text{‰}^{13}\text{C}_{\text{excess}} = (\text{Atom-}\text{‰}^{13}\text{C})_{\text{Markiert}} - (\text{Atom-}\text{‰}^{13}\text{C})_{\text{Basis}} \quad 1.5$$

Isotopenfraktionierung

Isotope und Moleküle, welche verschiedene Isotope eines Elementes enthalten, sog. isotopische Moleküle, besitzen weitgehend gleiche physikalische und chemische Eigenschaften. Aufgrund der bereits erwähnten unterschiedlichen Kernmassen existieren jedoch geringe Unterschiede. So weisen schwerere Isotope eine geringere Mobilität auf. Für die kinetische Energie eines Moleküls lässt sich bei konstanter Temperatur und kleinen Geschwindigkeiten folgende Näherungsformel anwenden:

$$E_{kin} \approx \frac{1}{2}mv^2 \quad 1.6$$

Da leichte (l) und schwere (s) Moleküle die gleiche Energie besitzen ergibt sich:

$$\frac{1}{2}m_s * v_s^2 = \frac{1}{2}m_l * v_l^2 \quad 1.7$$

$$\sqrt{\frac{m_s}{m_l}} = \frac{v_l}{v_s} \quad 1.8$$

Daher haben leichte Moleküle eine höhere Geschwindigkeit als schwere Moleküle. Dies bedeutet, dass letztere z. B. langsamer diffundieren oder die Kollisionsfrequenz mit anderen Molekülen niedriger ist, was dazu führt, dass sie langsamer reagieren [22].

Des Weiteren unterscheiden sich zwei Moleküle, welche das leichte oder schwere Isotop eines Elements enthalten hinsichtlich ihrer Nullpunktsenergie E_0 , der niedrigsten möglichen Energie eines Systems. Diese wird ihrerseits durch die Schwingungsfrequenz ν der Moleküle bestimmt wird, die wiederum von der reduzierten Masse der Bindungspartner μ abhängt. Der Zusammenhang wird durch die folgenden Gleichungen wiedergegeben:

$$E_0 = \frac{1}{2}h\nu \quad 1.9$$

$$\nu = \frac{1}{2\pi} * \sqrt{\frac{k'}{\mu}} \quad 1.10$$

$$\mu = \frac{(m_1 * m_2)}{(m_1 + m_2)} \quad 1.11$$

(h...Planck'sches Wirkungsquantum; k' ...Federkonstante; m_1, m_2 ...Massen der Bindungspartner)

Somit ergibt sich, dass die reduzierte Masse μ mit der Masse der Bindungspartner steigt, wodurch die Schwingungsfrequenz ν und damit die Nullpunktenergie fällt. Vereinfacht betrachtet bedeutet dies, dass die chemischen Bindungen in Molekülen mit schweren Isotopen fester, bzw. die Verbindungen reaktionsträger sind. Daher sind schwere Isotope in den Produkten einer Reaktion meist ab- und in den Edukten angereichert. Die höhere Schwingungsfrequenz der leichten Isotope bedeutet, dass sie beweglicher sind, wodurch die Wahrscheinlichkeit, bei einer chemischen Reaktion auf den Reaktionspartner zu treffen, steigt, d. h. sie sind reaktionsfreudiger. In Abb. 3 ist zur Veranschaulichung das Morse-Potential, ein Modell für den Verlauf der Potentialenergie eines zweiatomigen Moleküls in Abhängigkeit vom Kernabstand der Atome, dargestellt. $E_{0(s)}$ ist die Nullpunktenergie des schweren und $E_{0(l)}$ die des leichten isotopischen Moleküls. Man sieht, dass die Dissoziationsenergie des schweren isotopischen Moleküls ($D_{0(s)}$) größer ist, was bedeutet, dass mehr Energie zugeführt werden muss, um die Bindung zwischen den Atomen zu spalten. [22, 23]

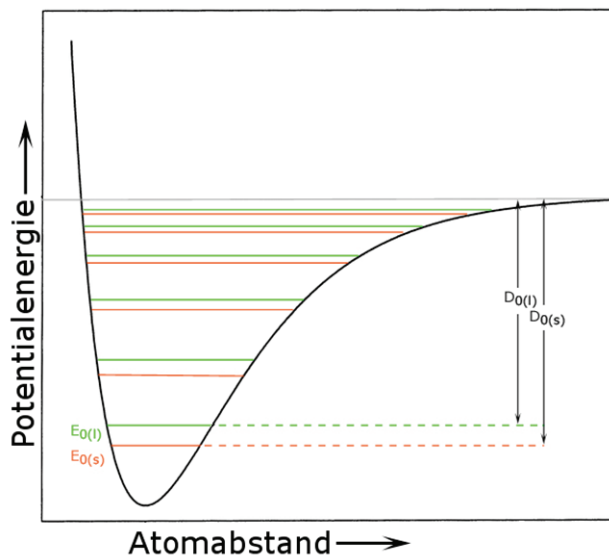


Abb. 3: Schematische Darstellung des Morse-Potentials für ein zweiatomiges Molekül (nach [22, 23]). Die roten Linien entsprechen den Schwingungsthermen des schweren isotopischen Moleküls, die grünen denen des leichten. Die Nullpunktenergien des schweren und leichten Moleküls sind $E_{0(s)}$ bzw. $E_{0(l)}$. D_0 steht in gleicher Weise für die Dissoziationsenergie.

Die relative Häufigkeit des selteneren stabilen Isotops eines Elements variiert zwischen verschiedenen Bestandteilen der Umwelt (z. B. biotisch, abiotisch, organisch, anorganisch) oder innerhalb von Organismen. Derartige Unterschiede in der Isotopenzusammensetzung sind auf die Fraktionierung der selteneren Isotope zwischen Kompartimenten zurückzuführen. Bedingt wird dies durch Isotopeneffekte, welche durch die zuvor beschriebenen Unterschiede in den chemischen und physikalischen Eigenschaften der Isotope eines Elements hervorgerufen werden. Man unterscheidet kinetische- und thermodynamische Isotopeneffekte bzw. Isotopenfraktionierung. Von kinetischen Isotopeneffekten, spricht man bei irreversiblen, also in nur eine Richtung verlaufenden Reaktionen ($A \rightarrow B$), bei denen sich die Reaktionsgeschwindigkeit des schweren und des leichten Isotops unterscheidet. Thermodynamische Isotopenfraktionierung wird auch als Gleichgewichtsfraktionierung bezeichnet. Sie tritt bei Gleichgewichtsreaktionen ($A \rightleftharpoons B$) auf, wobei die Lage des Gleichgewichts für das schwere und leichte Isotop verschieden ist. Die thermodynamische Isotopenfraktionierung ist im Gegensatz zur kinetischen temperaturabhängig. [20, 22, 135] Ein klassisches Beispiel für kinetische Fraktionierung ist die Diskrimi-

nierung von ^{13}C bzw. $^{13}\text{CO}_2$ durch das zentrale Enzym der Photosynthese RuBisCo, wodurch es zu einer ^{13}C -Abreicherung auf der Produktseite der Reaktion kommt. Die ungleiche Verteilung der Isotopenspezies $^{13}\text{C}/^{14}\text{C}$ auf beiden Seiten einer Wasser-Luft-Phasenbarriere ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$) ist hingegen ein Beispiel für eine Gleichgewichtsfractionierung [25].

Die Isotopenfractionierung, d. h. das Molverhältnis der betrachteten Isotope in der Verbindung B im Verhältnis zu dem in der Verbindung A (bei $A \rightarrow B$ oder $A \rightleftharpoons B$) wird mathematisch durch den Fractionierungsfaktor α ausgedrückt:

$$\alpha_{B-A} = \frac{R_B}{R_A} \quad 1.12$$

Da der Fractionierungsfaktor Zahlen sehr nahe Eins ergibt, wird die Abweichung meist als Fractionierung ε ausgedrückt, wobei:

$$\varepsilon = \frac{R_A}{R_B} = \alpha_{B-A} - 1 \quad 1.13$$

Da sich für ε entsprechend kleine Werte ergeben (z. B.: 0,003) erfolgt die Angabe oft in Promille (z. B.: $\varepsilon = 0,003 \rightarrow \varepsilon (\text{‰}) = (\alpha_{B-A} - 1) * 1000 = 3 \text{ ‰}$). Werte größer Null entsprechen damit einer Anreicherung, Werte kleiner Null einer Abreicherung des selteneren Isotops in der Verbindung B im Verhältnis zu A. [22]

2 Zielstellung dieser Arbeit

Die in dieser Arbeit ausgewerteten Versuche wurden 2009 und 2010 im Rahmen des BMBF-geförderten GABI SysSeed-Projektes an der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt. Das Ziel dieses Verbundprojektes war die Analyse und systembiologische Modellierung des primären Stoffwechsels im sich entwickelnden Gerstenendosperm. Das Modell soll die Auswirkungen genetischer Veränderungen auf Kornertrag und Inhaltstoffe bei Gerste (*Hordeum vulgare* L.) ermöglichen. Die in diesem und weiteren Arbeitspaketen durchgeführten Analysen liefern die für die Modellierung notwendigen Daten [127].

Für die Dissertation wurden die Gerstensorte 'Bomi' sowie die daraus erzeugten Mutanten Risø 16 und Risø 13, mit gestörter Stärkesynthese untersucht. Für diese Genotypen existieren zwar Inhaltstoffangaben im reifen Korn [58, 31, 32], jedoch gibt es keine Berichte über die Endospermentwicklung im frühen Zeitraum nach der Anthese und zur Bildungsdynamik der verschiedenen Proteinfractionen des Endosperms wie Albumine/Globuline, Hordeine und Gluteline, mit Ausnahme der Hordeinfraction von 'Bomi' [83]. Diese Vorgänge wurden in dieser Arbeit für die Termine 14 und 20 Tage nach Anthese untersucht.

In der Literatur wurde mehrfach postuliert, dass die Kohlenstoff- und Stickstoffeinlagerung bzw. die Stärke- und Proteinsynthese im Endosperm weitestgehend unabhängig voneinander erfolgen [49, 131, 132, 133, 126, 62]. Diese Theorie wird in der Dissertation überprüft und es wird weiterhin der Frage nachgegangen, ob sich durch die Defekte im Stärkemetabolismus der Mutanten Auswirkungen auf die Bildungsdynamik und Zusammensetzung der Proteinfractionen im Vergleich zum Wildtyp zeigen.

Um die Vorgänge im Endosperm auf der Ebene der Gesamtpflanze bewerten zu können, erfolgte die Bestimmung der Stickstoff- und Kohlenstoffmengen in den Blättern und Sprossachsen zu den Terminen 8, 14 sowie 20 Tage nach Anthese. Durch die Doppel-Pulsmarkierung mit den stabilen Isotopen ^{13}C und ^{15}N wurde weiterhin die Verteilung des aktuell assimilierten Kohlen- und Stick-

stoffs im Untersuchungszeitraum nachvollzogen und der Beitrag dieser Assimilate zur Kornfüllung bewertet.

Folgenden Fragestellungen wird in dieser Arbeit nachgegangen:

1. In welche Organe und in welchem Ausmaß erfolgt die Einlagerung des aktuell aufgenommen Stickstoffs und Kohlenstoffs in den Zeiträumen 4 - 8, 10 - 14 und 16 - 20 Tage nach Anthese (dpa)?
2. Welchen Beitrag liefern aktuell assimilierter sowie in den vegetativen Organen remobilisierter Stickstoff und Kohlenstoff zur Füllung des Endosperms in den untersuchten Zeiträumen?
3. Welche Auswirkungen hat die gestörte Stärkesynthese bei den Mutanten Risø 16 und Risø 13 auf die Stickstoff- und Kohlenstoffeinlagerung im Endosperm und die Stickstoffeinlagerung in die Proteinfractionen im Vergleich zum Wildtyp 'Bomi'?

3 Material und Methoden

3.1 Pflanzenmaterial

Vor Beginn der Hauptversuche wurden in den Jahren 2007 und 2008 Vorversuche mit den zweizeiligen Sommerbraugerstensorten *Hordeum vulgare* cv. 'Auriga' und cv. 'Golden Promise' durchgeführt. In diesen erfolgte die Optimierung der Gewächshauskulturbedingungen für Gerste, der Methode zur Bestimmung des Anthesezeitpunktes und der Isotopenmarkierung. Des Weiteren dienten sie der Erprobung der mikroskopiellen Methode zur Endospermpräparation. 'Golden Promise' wurde ausgewählt, da zu Beginn des GABI SysSeed-Projektes, in dessen Rahmen die Versuche durchgeführt wurden, angedacht war, diese Sorte zur Herstellung transgener Linien zu verwenden, welche ebenfalls in diesem Arbeitspaket untersucht werden sollten. Dies wurde jedoch im weiteren Verlauf des Projektes verworfen.

Für die Hauptversuche eins (2009) und zwei (2010) kam die Sorte 'Bomi' sowie die aus ihr erzeugten Mutanten Risø 16 und Risø 13 zum Einsatz. Das Ausgangssaatgut wurde vom Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben bereitgestellt und 2008 zunächst vermehrt, um ausreichend Saatgut für die anschließenden Versuche zu erzeugen. Bei dem Wildtyp 'Bomi' handelt es sich wie zuvor um eine zweizeilige Sommerbraugerste. Die Mutanten besitzen Defekte in der Stärkesynthese des Endosperms, deren Auswirkungen auf die Verteilung von Kohlenstoff und Stickstoff in der Pflanze und im Endosperm im frühen Zeitraum nach der Anthese untersucht wurde.

Bei Risø 16 wurde die Mutation durch Beschuss mit schnellen Neutronen bewirkt [29]. Dieser führte zu einer Deletion im Gen, welches die kleine Unter-einheit der zytosolischen ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase) codiert, wodurch deren Aktivität bei Risø 16 fehlt. Dies führt zu einer geringeren Stärkemenge im Endosperm, obgleich der Ausfall teilweise durch eine, im Vergleich zum Wildtyp, gesteigerte Syntheserate der plastidären Isoform des Enzyms kompensiert wird. Das besagte Gen (*HV.AGP.S.1*) codiert neben dem Transkript für die zytosolische AGPase im Endosperm ein zweites Transkript

für die kleine Untereinheit der plastidischen AGPase in den Blättern. Analysen ergaben, dass der Massenanteil der Stärke an der Frischmasse der Blätter am Ende der Photoperiode dadurch im Vergleich zum Wildtyp um 48 - 66 % niedriger ist [80]. Weiterhin wurde eine verringerte Aktivität des Stärke verzweigenden Enzyms (1,4- α -Glucan-verzweigendes Enzym) im Vergleich zum Wildtyp festgestellt [47]. Die Korntrockenmasse und die Stärkemenge im reifen Korn betragen bei dieser Mutante nach TESTER ET AL. (1993) 72 % bzw. 44 % (bzw. 64 % TM) von 'Bomi' [31]. In einer anderen Arbeit wurde für Risø 16 eine Stärkemenge im reifen Endosperm von 59 % des Wildtyp-Wertes berichtet [32].

Die Mutante Risø 13 wurde mittels EMS-Behandlung erzeugt [29]. Die Mutation betrifft ein Gen, welches einen plastidären ADP-Glucose Transporter im Endosperm codiert. Isolierte Plastiden sind in der Lage, aus extern bereitgestelltem Glucose-1-Phosphat Stärke zu synthetisieren, jedoch nur in sehr geringem Ausmaß (< 30 % von Plastiden des Wildtyps) aus ADP-Glucose. Die Körner haben daher hohe ADP-Glucose- und niedrige Stärkegehalte. Bei Risø 13 beträgt die Trockenmasse der Körner 74 % und die Stärkemenge im Endosperm 62 % des normalen Wertes ('Bomi') [32].

3.2 Versuchsfragen, -aufbau und -bedingungen

In den Jahren 2009 und 2010 wurden wie zuvor erwähnt zwei Gewächshausversuche mit den Genotypen 'Bomi' (Wildtyp), Risø 16 sowie Risø 13 (Mutanten), in der Lehr- und Forschungsstation Bereich Gewächshaus, der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt.

Im ersten Hauptversuch (2009) erfolgte die Untersuchung der Dynamik der C- und N-Akkumulation im Endosperm und in den vegetativen Organen des Haupttriebes für den Zeitraum nach der Anthese mittels der ^{13}C - und ^{15}N *in vivo* Doppelmarkierung. Da die Versuche im Rahmen des BMBF-geförderten GABI SysSeed-Projektes durchgeführt wurden, gab es sowohl Vorgaben bezüglich der zu verwendenden Genotypen als auch der zu untersuchenden Probenahmeterminen. Letztere waren 8, 14 und 20 Tage nach der Anthese (days post anthesis, dpa). Die Anzahl der Wiederholungen pro untersuchte Faktor-

stufe betrug in diesem Versuch vier. Durch den Einsatz der Mutanten mit verringerter Stärkesyntheseleistung wurde überprüft, welche Auswirkungen die Verringerung der *Sink*-Stärke des Endosperms für Kohlenstoff auf diese Prozesse hat. Der zweite Hauptversuch (2010) diente der Validierung der 2009 gewonnenen Daten für den Termin 20 dpa, jedoch wurde die Anzahl der Wiederholungen pro Prüfglied auf sieben erhöht. Ursprünglich sollte 2010 zusätzlich geklärt werden, welche Unterschiede im Vergleich der Haupttriebe von Pflanzen mit Bestockungstrieben und solchen, denen die Bestockungstriebe frühzeitig entfernt wurden, bestehen. Da die Ähren der beschnittenen Pflanzen jedoch in nahezu allen Fällen komplett infertil waren, war dies nicht möglich. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Prüffaktoren Genotyp, Probenahmetermin (nur 2009) und Versuchsjahr (20 dpa) untersucht wurden.

Die Durchführung erfolgte in Form eines randomisierten Gefäßversuches, wobei die Pflanzen in 5 Parzellen zu 35 Pflanzen angeordnet waren, wovon die zehn seitlichen einer Parzelle als Randpflanzen dienten (Abb. 4 und Abb. 5). Jede Parzelle verfügte über eine artifizielle Lichtquelle (Na-Dampflampe) um eine möglichst gleichmäßige Beleuchtung ($14 \text{ h} * \text{d}^{-1}$) zu gewährleisten. Das Temperaturregime wurde mit einem Tag-Nacht-Verhältnis von 20°C zu 16°C vorgegeben und konnte bis zu einem gewissen Grad durch Heizung, Belüftung und eine computergesteuerte Außenbeschattung geregelt werden. Bei sehr hohen Außentemperaturen wurde jedoch die Obergrenze überschritten. Mit dem Ziel, möglichen Gradienten in der Gewächshauskabine entgegenzuwirken, erfolgte vierzehntägig ein Standortwechsel ganzer Parzellen, verbunden mit der Neuordnung der zu beprobenden Pflanzen nach dem Zufallsprinzip. Die Pflanzen waren sehr gut mit Stickstoff versorgt. Das Ausgangssubstrat enthielt ca. 600 mg N pro Gefäß aus Startdüngung (Plantacote 4M) und Düngergzusatz im Klamann-Substratbestandteil sowie weitere 2580 mg N mit unbekannter Pflanzenverfügbarkeit. Allein der Stickstoff aus Düngergzusatz entspricht einer Menge von $330 \text{ kg} * \text{ha}^{-1}$. Im Verlauf des Versuches wurden als Schossergabe $60 \text{ mg N} * \text{Gefäß}^{-1}$, als Ährengaben $48 \text{ mg N} * \text{Gefäß}^{-1}$, und zur Markierung $14 \text{ mg N} * \text{Gefäß}^{-1}$ zugeführt. Insgesamt erhielten die Pflanzen somit 722 mg N ($408 \text{ kg} * \text{ha}^{-1}$) durch die Düngung. Dies allein stellt schon eine sehr gute N-Versorgung dar und mit hoher Wahrscheinlichkeit ist den

Pflanzen auch noch ein Teil der restlichen 2580 mg N zugänglich gewesen. Die wichtigsten Parameter für die Hauptversuche eins und zwei sind in Anhang I aufgelistet.

In Tab. 2 sind die Werte für die Dauer der vegetativen Phase, vom Auflaufen der Pflanzen bis zum Beginn der Anthese für die Versuche 2009 und 2010 aufgelistet. Es ist zu erkennen, dass lediglich bei Mutante Risø 13 ein Unterschied zwischen den Versuchsjahren in Form einer zügigeren Entwicklung (- 4 d) in 2009 festgestellt wurde. Die Umweltbedingungen im Zeitraum von der Anthese bis zur Probenahme für Pflanzen, welche zu 20 dpa beprobt wurden, finden sich ebenfalls in Tab. 2. Während hinsichtlich der Temperatursumme keine Abweichung zwischen den Versuchsjahren auftrat, war die summierte Photoperiode 2010 im Mittel aller Genotypen um 22,8 Stunden kürzer und das Tagesmittel der rLF lag um 8,3 % höher. Zur Abweichung der Photoperiode kam es trotz gleicher Zusatzbeleuchtung von 14 Stunden pro Tag, da diese 2010 eine Stunde vorverlegt und die Interaktion mit natürlicher Beleuchtung nicht beachtet wurde.

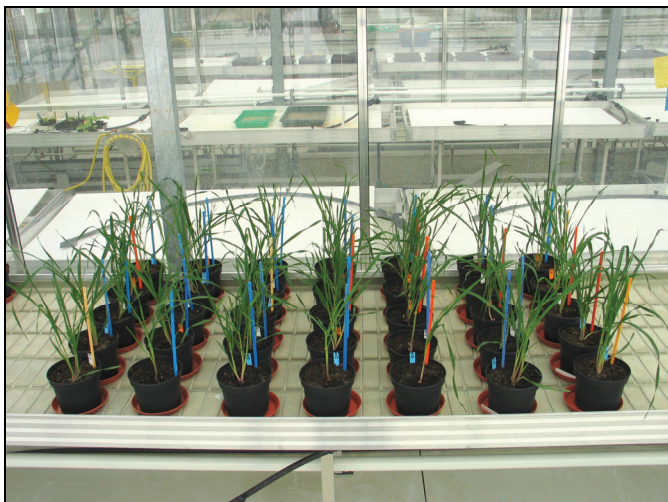


Abb. 4: Einzelparzelle im zweiten Hauptversuch 2010



Abb. 5: Gesamtansicht des zweiten Hauptversuches 2010

Tab. 2: Dauer der vegetativen Phase (Auflaufen – Anthese) sowie der Umweltbedingungen im Zeitraum von der Anthese bis zur Probenahme für die Versuchsjahre 2009 und 2010 (20 dpa). Die summierte Photoperiode, Temperatursumme und das Tagesmittel der relativen Luftfeuchte (rLF) wurden mit den Werten von Sonnenauf- bis Sonnenuntergang berechnet. (Werte \pm SE; Homogene Gruppen: Vergleich der Versuchsjahre je Genotyp)

Parameter	‘Bomi’		Risø 16		Risø 13	
	2009	2010	2009	2010	2009	2010
Dauer vegetative Phase [d]	69 $\pm 2^a$	69 $\pm 1^a$	68 $\pm 2^a$	70 $\pm 1^a$	65 $\pm 1^a$	69 $\pm 1^b$
summierte Photoperiode [h]	321,7 $\pm 1,3^a$	297,4 $\pm 0,3^b$	320,9 $\pm 1,4^a$	297,9 $\pm 0,3^b$	318,6 $\pm 1,1^a$	297,5 $\pm 0,3^b$
Temperatursumme [°C]	459,8 $\pm 4,0^a$	455,3 $\pm 0,4^a$	460,1 $\pm 3,9^a$	455,4 $\pm 0,4^a$	454,8 $\pm 1,4^a$	455,1 $\pm 0,3^a$
Tagesmittel rLF [%]	43,8 $\pm 1,5^a$	53,5 $\pm 0,7^b$	44,3 $\pm 1,6^a$	52,5 $\pm 0,7^b$	47,4 $\pm 1,5^a$	53,5 $\pm 0,6^b$

3.3 *In vivo* ^{13}C - und ^{15}N -Doppelmarkierung

Zur Untersuchung der Kohlenstoff- und Stickstoffverlagerung am Haupttrieb im Zeitraum nach der Anthese wurden die Gerstenpflanzen mit ^{13}C und ^{15}N pulsmarkiert. Dies erfolgte jeweils um 10.00 Uhr. Der optimale zeitliche Abstand zwischen Markierung und Probenahme wurde in einem Vorversuch ermittelt. Zu diesem Zweck wurden Pflanzen der Sorte ‘Auriga’ zur Anthese

markiert. Im Anschluss erfolgte über einen Zeitraum von 7 Tagen die tägliche Beprobung von je zwei Pflanzen, deren Karyopsen hinsichtlich ^{15}N und ^{13}C analysiert wurden. Tendenziell nahm die ^{15}N -Konzentration im zeitlichen Verlauf ab, während die ^{13}C -Konzentration anstieg. Als optimale Zeitdauer zwischen Markierung und Probenahme hinsichtlich einer maximalen Anreicherung beider Isotope wurde vier Tage erachtet (Abb. 6).

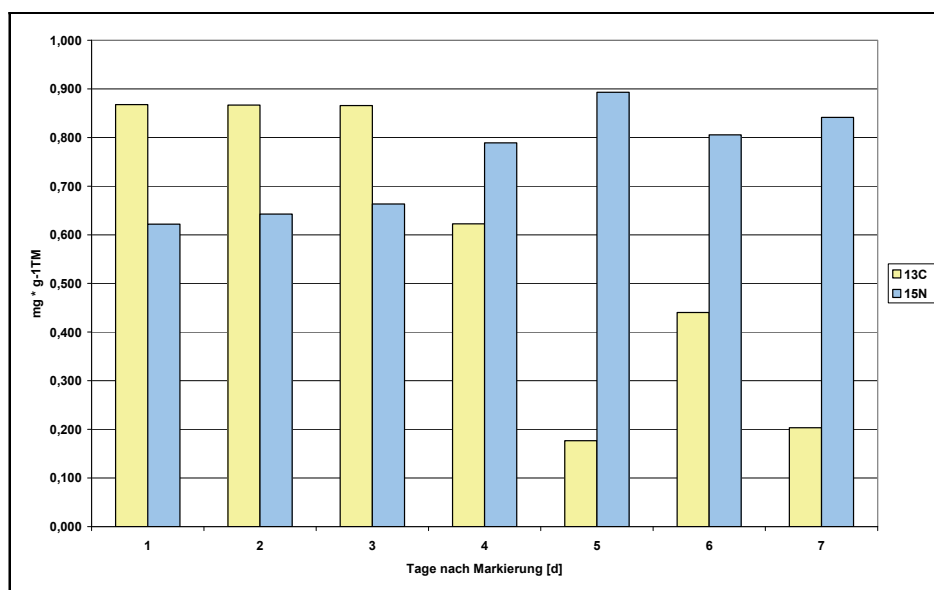


Abb. 6: Trockenmasseanteile der Isotopen ^{15}N und ^{13}C in Karyopsen von *Hordeum vulgare* cv. 'Auriga' [mg * g⁻¹ TM] im zeitlichen Verlauf nach der Markierung zum Tag Null. (Anthesezeitpunkt nach BBCH-Skala: „Code 49 – Grannenspitzen werden über der Ligula des Fahnenblattes sichtbar“, n = 1 - 2, Tag 2 aus den Werten von Tag 1 und 3 interpoliert)

Für die ^{13}C -Markierung wurden die Pflanzen für einen Zeitraum von 60 Minuten in runde Plastiksäcke (Durchmesser: 59,5 cm, Höhe 150 cm, LDPE-Folie, transparent, 150 µm Folienstärke, Roundliner GmbH, Forst, Deutschland) luftdicht eingeschlossen. In diesen Gefäßen erfolgte die Freisetzung von $^{13}\text{CO}_2$ aus 0,4473 g $\text{Ba}^{13}\text{CO}_3$ (Anreicherung 98 Atom-%, CAMPRO Scientific, Berlin, Deutschland) nach Zugabe von 10 ml einer 0,45 M Perchlorsäure (im Überschuss):



Die Optimierung der Einwirkzeit, Applikationsart sowie der eingesetzte Menge $\text{Ba}^{13}\text{CO}_3$ erfolgten vor Beginn dieser Arbeit in einem anderen Projekt. In dieser Arbeit wurden die bereits optimierten Parameter angewandt (mündliche Mitteilung Dr. Götz K.-P., LGF, HU-Berlin). Angemerkt sei an dieser Stelle, dass eine zu lange Einschlusszeit in den luftdicht verschlossenen Behältnissen die Pflanzen stresst, was zu Veränderungen im Stoffwechsel führt. Die Höhe der ^{13}C -Markierung ist hinsichtlich zwei Parametern optimiert worden. Zum einen ist eine möglichst hohe Anreicherung erwünscht, um auch nach Wirken des Verdünnungseffektes das Isotop messtechnisch in verschiedenen Kompartimenten erfassen zu können, zum anderen ist die Höhe der Anreicherung limitiert durch die Analyse im Massenspektrometer, bei welchem zu hohe Signaturen zu unerwünschten Memoryeffekten führen.

Direkt im Anschluss an die ^{13}C -, erfolgte die ^{15}N -Markierung. Hierzu erhielten die Pflanzen 150 ml einer 6,3 mM $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung (Anreicherung 95 Atom-%, CAMPRO Scientific, Berlin, Deutschland), welche sie über die Wurzeln aufnahmen. Dies entspricht einer theoretisch verfügbaren Menge von 13,978 mg ^{15}N pro Pflanze. Zur Vermeidung stärkerer Ammoniakverluste wurde sehr darauf geachtet, dass das Substrat der Pflanzen stets ausreichend feucht war.

3.4 Bestimmung des Anthesezeitpunktes

In der vorliegenden Arbeit wurden Gerstenpflanzen und insbesondere deren Endosperme zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Anthese untersucht. Eine zwingende Voraussetzung zum Gelingen dieser Untersuchungen ist die möglichst genaue Bestimmung des Anthesezeitpunktes.

In Vorversuchen wurde zunächst getestet, ob dieser mit den phänologischen Entwicklungsstadien nach BBCH-Codierung in Verbindung zu setzen ist. Die Beprobung erfolgte, wenn die Grannenspitzen der Ähre des Haupttriebes die Ligula des Fahnenblattes um 1,5 cm überragten (BBCH-Skala, Code 49). Die Untersuchung der Blütenmerkmale sowie der Trockenmassen der Karyopsen ergab jedoch, dass die Methode ungeeignet ist, da sich die Ähren in verschiedenen Entwicklungsstadien befanden (nicht dargestellt).

Für alle nachfolgenden Untersuchungen erfolgte die Bestimmung des Anthezeitpunktes nach der Methode, welche am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben angewandt wird. Die Bonitur beginnt, wenn sich die Pflanzen im BBCH-Stadium 45 („Blattscheide des Fahnenblattes geschwollen“) befinden. Täglich erfolgt nun die Kontrolle, in welcher Position sich die Ähre im Fahnenblatt befindet. Die Anthese setzt ein, wenn ein deutliches Anschwellen der Ähre eintritt, was durch vorsichtiges Abtasten der Blattscheide des Fahnenblattes wahrnehmbar ist (ca. BBCH-Stadium 49). Zu diesem Zeitpunkt erfolgt ein behutsames Auswickeln der Ähre aus der Blattscheide. Ein erstes Zeichen für die Anthese ist, wenn die Antheren gelblich durch die Deckspelze scheinen und die Ährchen leicht angeschwollen sind. Da die Anthese der Blüten in der Mitte der Ähre beginnt (ca. 5. Ährchen einer Zeile von der Ährenspindelbasis aufwärts), wird an dieser Position ein Ährchen beprobt und soweit von den Spelzen befreit, dass die fertilen Blütenorgane freigelegt sind. Folgende, in Abb. 7 dargestellte Merkmale des Ährchens definieren die Anthese:

1. Die Antheren sind gelblich und an der Spitze leicht geöffnet, was mit einer Lupe untersucht werden kann. Bei leichtem Anschnippen rieselt Pollen aus ihnen.
2. Die Filamente der Stamina sind schlaff und nicht mehr steif.
3. Die Lodiculae sind prall gefüllt.
4. Die Narbenäste des Gynoezeums sind voll entfaltet und klebrig.

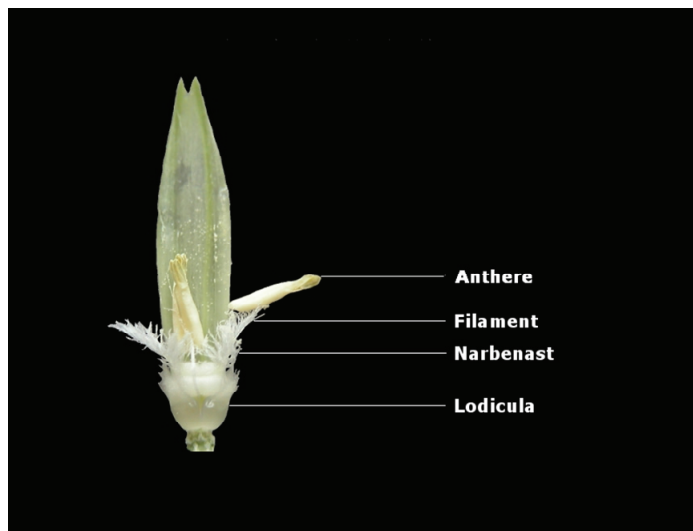


Abb. 7: Blüte von *Hordeum vulgare* L. zum Zeitpunkt der Anthese mit Beschriftung der Blütenorgane, welche zur Bestimmung des Anthesezeitpunktes untersucht wurden.

Die Bearbeitung erfolgte stets durch denselben Bearbeiter, um zufällige Fehler zu minimieren. Ist der Anthesezeitpunkt bestimmt, wird die Ähre mit einem Etikett versehen, auf welchem dieser vermerkt ist. Auch diese Methode beinhaltet eine gewisse Ungenauigkeit, da die Ährchen einer Blüte nicht alle zum gleichen Zeitpunkt das Stadium der Anthese erreichen. Zur Minimierung dieses Fehlers werden nur die zehn mittleren Ährchen zu einem späteren Zeitpunkt beprobt.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die Triebe einer Pflanze in der Regel nicht synchron in das Anthesestadium übergehen. Da jedoch ein definierter Termin nach der Anthese untersucht werden soll, was wiederum die Isotopenmarkierung zu einem festgelegten Zeitpunkt erfordert, wird dieser nur durch einen Trieb charakterisiert. Im Vergleich zum Haupttrieb würden die Bestockungstriebe beispielsweise zu 0 oder 2 dpa markiert und anschließend zu 4 bzw. 6 dpa beprobt. Die Untersuchung des Haupttriebes ist somit bei dieser Versuchsanordnung die bestmögliche Variante, da er in der Regel zuerst blüht und sich alle übrigen Triebe in einem früheren Entwicklungsstadium befinden.

3.5 Probenahme, Endospermpräparation und Probenaufarbeitung

Zu den einzelnen Probenahmeterminen wurden die Pflanzen über der Substratoberfläche abgeschnitten. Im Anschluss erfolgte die Entnahme des Haupttriebes und dessen Zerlegung in die Fraktionen Sprossachse, untere Blätter (inkl. Blattscheide), Fahnenblatt und Ähre. Die Lagerung der Ähre erfolgte bis zur weiteren Aufarbeitung auf Eis, alle übrigen Organe wurden in vorbereitete Papiertüten überführt und bei 40 °C im Trockenschrank bis zur Massekonstanz getrocknet. Die Seitentriebe einer Pflanze wurden zusammengeführt, wie zuvor beschrieben getrocknet und im Bedarfsfall zu einem späteren Zeitpunkt in Sprossachsen, Blätter, Fahnenblätter und Ähren separiert.

Nach Abschluss der Beprobung fand die Präparation der Endosperme statt. Von den gekühlten Ähren wurden hierzu die zehn mittleren Ährchen entnommen (je Zeile fünf Endosperme über den basalen drei) und anschließend die Karyopsen von den Spelzen und übrigen Blütenorganen befreit. Zu den Beprobungsterminen 8 dpa und 14 dpa erfolgte die Entfernung des Perikarps und des Embryos unter einem Stereomikroskop. Hierzu wurde das Perikarp zunächst entlang der Bauchfurche flach aufgeschnitten und anschließend mittels zweier Präzisionspinzetten vorsichtig von der Samenschale gelöst und entfernt. Zu 20 dpa war die Präparation ohne Mikroskop möglich. Die Endosperme wurden bei – 20 °C in der Kühltruhe gelagert, zeitnah gefriergetrocknet und anschließend in einer Kugelmühle (Retsch M1, Haan, Deutschland; Mahlbecher: Stahl, Volumen = 10 ml) zu einem feinen Mehl zermahlen.

Die vegetativen Organe des Haupttriebes wurden nach der Trocknung kleingeschnitten und mit Hilfe der Kugelmühle zu einem Pulver zermahlen. Die Zerkleinerung der Organe der Bestockungstriebe erfolgte mit einer Mikroschlagmühle (Culatti DHF 48, Zürich, Schweiz; Siebeinsatz: 0,5 mm Porenweite).

Die Aufbewahrung getrockneter Endosperme, des Endospermmehls und gemahlener Proben von vegetativen Organen der Haupttriebe erfolgte in einem abgedunkelten Exsikkator bei Raumtemperatur.

3.6 Fraktionierung des Endosperms

Zur genaueren Untersuchung der Proteinzusammensetzung in den Endospermen wurden diese einer nasschemischen, sequentiellen Fraktionierung unterzogen. Ausgehend von einer Probe erfolgte die Extraktion von Lipiden (Entfettung), Albuminen und Globulinen, Hordeinen und Glutelinen aus dem Endospermmehl (Protokoll in Tab. 3). Endosperme vom Probenahmezeitpunkt 8 dpa konnten aufgrund der geringen verfügbaren Probemassen nicht fraktioniert werden, da die Masse der daraus gewonnen Fraktionen für die nachfolgenden Analysen nicht ausreichend hoch gewesen wäre.

Die Extraktionsschritte wurden in 10 ml Zentrifugenröhrchen (Oak Ridge - PPCO, Nalgene, Rochester, USA) durchgeführt. Die Einwaagen an Endospermmehl unterschieden sich zwischen den Versuchen und z. T. zwischen den Proben. Das Verhältnis Probe zu Lösungsmittel betrug in allen Fällen 1 : 15 (w/v, [37]), lediglich bei den Waschschritten und bei der Stärkeextraktion wurden feste Volumina eingesetzt. Die Extraktion einer Probencharge nahm drei Tage in Anspruch. Waren die Extraktionsschritte eines Tages abgearbeitet, wurden die Proben über Nacht bei - 20 °C in der Tiefkühltruhe gelagert.

Im ersten Schritt wurden die Lipide aus der Probe mit 1-Butanol in dreifacher Wiederholung extrahiert [33, 34]. Aus dem verbleibenden Pellet erfolgte im Anschluss die Extraktion der wasser- sowie der salzlöslichen Proteinfraction, d. h. der Albumine und Globuline mit einem salzhaltigen Puffer (0,5 M NaCl, 0,05 M NaPO₄, pH 7,8) [96, 35, 33]. Die Nicht-Protein-Stickstoffverbindungen werden bei diesem Schritt ebenfalls mit extrahiert. Nach zwei Waschschritten mit je 8 ml destilliertem Wasser erfolgte die Extraktion der Hordein-Proteinfraction (60 °C, 2 x 60 min, 50 % Propan-2-ol, 2 % Mercaptoethanol) [36]. Die dritte Proteinfraction, die Gluteline, wurde nach erneutem Waschen des Pellets (2 x 8 ml H₂O_{dest.}) mit 2 % 2-Mercaptoethanol, 0,5 % SDS und 0,05 % NaB₄O₄ (Raumtemperatur, pH 10) extrahiert [34, 35, 37]. Bei allen drei Proteinfractionen wurden die vereinigten Überstände der Extraktionsschritte auf ca. 1,5 ml eingengt. Die Ausfällung der Albumine/Globuline sowie der Gluteline erfolgte im Anschluss mit 60 % (v/v) Aceton (99,5 %, 99,5 %).

Merck, Darmstadt). Die Hordeine fielen beim Einengungsschritt durch das Verdampfen der organischen Lösungsmittel aus. Die nach Zentrifugation gewonnenen Proteinpellets wurden mit destilliertem Wasser gewaschen um Pufferreste zu entfernen, und anschließend bei - 20 °C bis zur zeitnahen Gefrier-trocknung gelagert.

Tab. 3: Extraktionsprotokoll zur sequentiellen Fraktionierung von Lipiden, Albuminen und Globulinen, Hordeinen und Glutelinen aus Endospermen von *Hordeum vulgare* L..

Extraktionsschritt 1 (Lipide)	2 x 60 min, 1 x 30 min mit 1-Butanol (1 : 15, w/v) bei 4 °C (auf Eis), geschüttelt, Zentrifugation: 8000 g x 20 min, 4 °C, Festwinkelrotor
Extraktionsschritt 2 (Albumine + Globuline)	2 x 60 min mit 0,5 M NaCl, 0,05 M NaPO ₄ , pH 7,8 (1 : 15, w/v) bei 4 °C (auf Eis), geschüttelt, Zentrifugation: 8000 g x 20 min, 4 °C, Festwinkelrotor
	<p>Überstände vereinigen, im Becherglas (15 ml) unter Rühren bei 80 °C auf ca. 1,5 ml einengen, in 15 ml Greinerröhrchen überführen (Becherglas mit 1 ml H₂O_{dest.} spülen und mit Überstand vereinigen)</p> <p>Proteinfällung mit 60 % (v/v) eiskaltem Aceton für 30 min im Kühlschrank</p> <p>Zentrifugation: 4800 g x 20 min, 4 °C, Aus-schwingrotor</p> <p>Pellet 2 x mit 8 ml H₂O_{dest.} waschen, Zentrifugation wie zuvor</p> <p>Pellet bei - 20 °C in der Tiefkühltruhe bis zur anschließenden Gefriertrocknung lagern</p>
Extraktionsschritt 3 (Hordeine)	2 x 60 min mit (1 : 15, w/v) 55 % (v/v) Propan-2-ol, 2 % 2-Mercaptoethanol bei 60 °C (im Wasserbad, alle 15 min Proben aufschütteln) Zentrifugation: 8000 g x 20 min, 22 °C, Festwinkelrotor
	<p>Überstände vereinigen, im Becherglas (15 ml) unter Rühren bei 80 °C auf ca. 1,5 ml einengen, in 15 ml Greinerröhrchen überführen (Becherglas mit 1 ml H₂O_{dest.} spülen und mit Überstand vereinigen)</p> <p>Proteinfällung für 60 min im Kühlschrank</p>

	<p>Zentrifugation: 4800 g x 20 min, 4 °C, Aus-schwingrotor</p> <p>Pellet 2 x mit 8 ml H₂O_{dest} waschen, Zentrifugati-on wie zuvor</p> <p>Pellet bei – 20 °C in der Tiefkühltruhe bis zur an-schließenden Gefriertrocknung lagern</p>
Extraktionsschritt 4 (Gluteline)	<p>2 x 60 min mit (1 : 15, w/v) 2 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,5 % SDS, 0,05 M NaB₄O₄, pH 10, Raumtemperatur (ca. 22 °C), geschüttelt</p> <p>Zentrifugation: 8000 g x 20 min, 22 °C, Festwin- kelrotor</p> <p>Überstände vereinigen, im Becherglas (15 ml) unter Rühren bei 80 °C auf ca. 1,5 ml einengen, in 15 ml Greinerröhrchen überführen (Becherglas mit 1 ml Extraktionspuffer. spülen und mit Über-stand vereinigen)</p> <p>Proteinfällung mit 60 % (v/v) eiskaltem Aceton für 60 min im Kühlschrank</p> <p>Zentrifugation: 4800 g x 20 min, 22 °C, Aus-schwingrotor</p> <p>Pellet 3 x mit 8 ml H₂O_{dest} waschen, Zentrifugati-on wie zuvor</p> <p>Pellet bei – 20 °C in der Tiefkühltruhe bis zur an-schließenden Gefriertrocknung lagern</p>

3.7 Probenanalytik

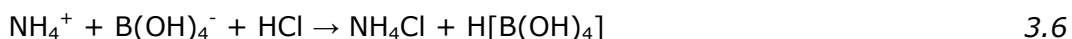
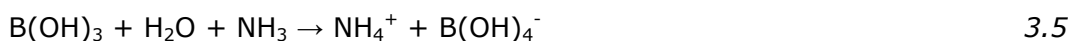
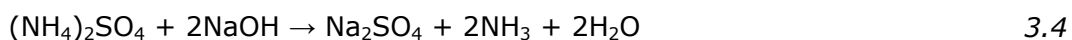
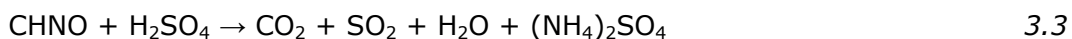
Das allgemeine Vorgehen bestand darin, für die vegetativen Organe des Haupttriebes die Parameter Trockenmasse, Gesamt-Kohlenstoffmenge und -Stickstoffmenge, ¹³C- sowie ¹⁵N-Anreicherung zu bestimmen. Im ersten Hauptversuch (2009) erfolgte die separate Bestimmung dieser Messgrößen für das Fahnenblatt. Dabei kam es zu zahlreichen Ausfällen bzw. Probenverlusten im Zuge der Analytik. Da es sich um sehr kleine Proben handelte, waren keine Messwiederholungen möglich, weshalb viele Werte für die Fahnenblätter fehlen. Aus diesem Grund wurde entschieden, die Blätter und das Fahnenblatt aus Hauptversuch zwei nach der Trockenmassebestimmung als Mischprobe zu

analysieren. Somit sind die Analyseergebnisse der Blattfraktion der Versuche in 2009 und 2010 nicht direkt vergleichbar.

Für das Endosperm und die Proteinfractionen wurden die Parameter Trockenmasse, Stickstoffmenge und ^{15}N -Anreicherung bestimmt. Die Messung der ^{13}C -Anreicherung erfolgte jedoch nur für die Endosperme. Eine Gesamt-Kohlenstoffbestimmung war aufgrund der dafür nötigen Einwaagen und den geringen Probenmassen nicht möglich.

3.7.1 Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl

Die Bestimmung der Stickstoffmengen in Karyopsen aus dem Vorversuch zur Ermittlung des optimalen Abstandes zwischen Markierung und Probenahme sowie der Rohproteinmenge in reifen Körnern aus dem ersten Hauptversuch erfolgte mittels der Kjeldahl Methode. Hierbei wird die Probe zunächst unter Erhitzung mit konzentrierter Schwefelsäure unter Zugabe einer Katalysatormischung aufgeschlossen, wobei der organische Kohlenstoff zu Kohlendioxid oxidiert und der Stickstoff in Ammoniumsulfat überführt wird (Gl. 3.3). Anschließend erfolgt die Alkalisierung durch Zugabe von Natriumhydroxid, wodurch Ammoniak ausgetrieben wird (Gl. 3.4), welcher durch Wasserdampfdestillation in eine Borsäurevorlage überführt wird (Gl. 3.5). Zur Bestimmung der NH_4^+ -Menge in der Vorlage erfolgt die Titration mit 0,1 N (= 0.1 M) Salzsäure bis zum Farbumschlag des enthaltenen Indikators (Gl. 3.6). Durch Berechnung der eingesetzten Stoffmenge HCl (Gl. 3.7 & 3.8) erhält man gleichzeitig die Stoffmenge für NH_4^+ , da die Umsetzung beider im Verhältnis 1 : 1 erfolgt (Gl. 3.9). Über die Stoffmenge und dem Wissen, dass in einem Mol NH_4Cl 14 g N enthalten sind, lässt sich schließlich die Masse des Stickstoffs in der Ausgangsprobe bestimmen (Gl. 3.10). Durch Multiplikation mit einem Stickstoff-Protein-Umrechnungsfaktor ergibt sich der Proteingehalt. Ein international verwendeter Faktor für ganze Gerstenkörner ist 6,83 [74]. Dabei ist jedoch zu beachten, dass solch ein allgemeiner Faktor eine Näherung darstellt, da der Stickstoffanteil in den einzelnen Proteinfractionen nicht identisch ist und deren Anteile am Gesamtprotein variabel sind. Weiterhin variiert die Aminosäurezusammensetzung der einzelnen Fraktionen in Abhängigkeit von Genotyp und Kulturbedingungen. Einen großen Einfluss hat ebenfalls der Anteil der NPN-Fraktion in den untersuchten Proben [75].



$$n = M * m \quad 3.7$$

$$n(\text{HCl}) = 0,1 [\text{mol} * \text{l}^{-1}] * \text{titriertes Volumen [l]} \quad 3.8$$

$$n(\text{HCl}) = n(\text{NH}_4^+) \quad 3.9$$

$$m(\text{N}) [\text{g}] = n(\text{NH}_4^+) [\text{mol}] * 14 [\text{g} * \text{mol}^{-1}] \quad 3.10$$

Durchführung:

In Vorbereitung der Stickstoffbestimmung wurden die Proben bei 40 °C im Trockenschrank (Modell 600, Memmert GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland) getrocknet, um einheitliche Wassergehalte zu erreichen. Mittels einer Analysenwaage (Genauigkeit 0,1 mg, Chyo Balance Corp., Komatsu, Japan) erfolgte die Bestimmung der exakten Einwaage (0,1 - 0,5 g). Diese Proben wurden anschließend in 200 ml Kjeldahl-Aufschlusskolben überführt. Nach Zugabe von 20 ml konzentrierter Schwefelsäure (95 - 97 %, zur Analyse, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und einer Tablette mit Katalysatormischung erfolgte der Aufschluss für eine Stunde. Die Farbe der Probenlösung nach dieser Prozedur musste klar und hellgrün sein. Nach dem Abkühlen der Proben wurden zum Austreiben des Ammoniaks ca. 25 ml konz. NaOH (~ 32 %, zur Kjeldahl-Stickstoffbestimmung, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) zugesetzt. Anschließend erfolgten die Zugabe von 20 ml destilliertem Wasser und die Dampfdestillation. Das Destillat wurde in 200 ml Erlenmeyerkolben aufgefangen, welche 50 ml eines Gemisches aus Borsäure und einem Indikator enthielten aufgefangen (0,3 mol * l⁻¹ H₃BO₃ und 2 ml * l⁻¹ Indikatorstammlösung in destilliertem Wasser; Indikatorstammlösung: 1,25 g Methylenrot und 0,85 g Methylenblau R in 1 l Wasser). Abschließend wurde mit 0,1 N HCl titriert, bis ein Indikator-Farbumschlag von grün nach rot erfolgte. Die verwendete Kjeldahl-Apparatur setzte sich aus folgen-

den Komponenten zusammen: Aufschlussapparatur BÜCHI 430, Destillations-einheit BÜCHI 322, Gaswascheinheit Büchi 412, Kontrolleinheit 342 (BÜCHI Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland), Titrationseinheit 702 SM Titrino (Deutsche Metrohm GmbH & Co, Filderstadt, Deutschland).

3.7.2 ^{15}N -Bestimmung

Die Bestimmung der ^{15}N -Anreicherung in Proben erfolgte mittels eines emissionspektrometrischen Analysensystems (NOI-6EPC, Fischer-Analysen Instrumente GmbH, Leipzig, Deutschland), welches an einen vollautomatischen, nach dem Dumas-Prinzip funktionierenden, Elementaranalysator (vario EL, Elementar-Analysensysteme GmbH, Hanau, Deutschland, nach DIN ISO 13878, 1998) gekoppelt war. Das Funktionsprinzip in Kürze: Die Proben werden bei 950 °C in einer sauerstoffreichen Heliumatmosphäre oxidativ aufgeschlossen und die Oxidationsprodukte anschließend durch einen Helium-Trärgasstrom in das System geleitet. In einem nachgeschalteten Reduktionsrohr erfolgt die Reduktion der Stickoxide zu elementarem Stickstoff an einem Kupferkontakt, überschüssiger Sauerstoff wird entfernt. Ein anderes Adsorbtionsmittel entfernt an dieser Stelle Halogenverbindungen aus dem Gasstrom. In einer Sequenz von Adsorbtionssäulen werden anschließend die Bestandteile der Gasmischung, CO_2 , H_2O , N_2 und SO_2 aufgetrennt und einzeln einer Wärmeleitfähigkeitsmesszelle zugeführt. Es ist anzumerken, dass die so gewonnen Werte für den Gesamt-N nicht für Auswertungen herangezogen wurden, sondern nur jene aus der simultanen Gesamt-C- und -N-Bestimmung (ebenfalls Dumas-Verbrennung). Nach der Gesamt-Stickstoffbestimmung wird der $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Gasstrom in das NOI-6PC geleitet und in einem Gasentladungsrohr durch Hochfrequenz zur Lichtemission angeregt. Ein Gittermonochromator spaltet dieses Licht in seine Spektralteile, welche von einem Detektor erfasst werden. Auf diese Weise werden die $^{15}\text{N}_2$ - (298,86 nm), $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ (298,29 nm) und die $^{14}\text{N}_2$ -Bande (297,68 nm) des Stickstoff-Emissionsspektrums erfasst und die relative ^{15}N -Isotopenhäufigkeit von der Messsoftware auf dem angeschlossenen Computer berechnet [nach: Bedienungsanleitung vario EL, Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau; Bedienungsanleitung NOI-6EPC, Fischer Analysen Instrumente GmbH, Leipzig].

In einigen Fällen wurden Proben nach der Kjeldahl-Analytik hinsichtlich ^{15}N analysiert. Die relative ^{15}N Isotopenhäufigkeit in den NH_4Cl -Proben wurde dann ebenfalls emissionsspektrometrisch bestimmt (Isonitromat 5200, Statron, Fürstenwalde, Deutschland). Das Resultat dieser Messungen ist das bestimmte Isotopenverhältnis, bzw. die relative Häufigkeit des ^{15}N (Atom-% ^{15}N ; entsprechend Gl. 1.1). Um den ^{15}N -Überschuss (Atom-% $^{15}\text{N}_{\text{excess}}$) zu bestimmen, also den Anteil, welcher sich von der natürlichen Isotopenzusammensetzung des Stickstoffs unterscheidet, wird die natürliche relative Häufigkeit (Atom-% $^{15}\text{N}_{\text{Standard}}$) abgezogen (entsprechend Gl. 1.4 bzw. 1.5). Schließlich lässt sich mittels Gleichung 3.11 (aus [76]) die Überschussmasse des ^{15}N in der untersuchten Probe bestimmen:

$$\text{Masse}^{15}\text{N}_{\text{Probe}} = \frac{15 * \text{Atom-\%}^{15}\text{N}_{\text{excess}} * \text{MasseN}_{\text{Probe}}}{1400 + \text{Atom-\%}^{15}\text{N}_{\text{excess}}} \quad 3.11$$

3.7.3 Simultane Bestimmung von Gesamt-C und -N

Die Bestimmung der Gesamt-Kohlenstoff- und -Stickstoffmengen in den Proben erfolgte ebenfalls mittels eines Elementaranalysators (vario MAX CNS, Elementar-Analysensysteme GmbH, Hanau, Deutschland). Dieser gleicht in seiner Funktionsweise dem zuvor beschriebenen „vario EL“ Gerät auch in Detektion der Messkomponenten mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor.

3.7.4 ^{13}C -Bestimmung

Die ^{13}C -Bestimmung erfolgte massenspektrometrisch (Tracer mass 20-20, SerCon, Crewe, UK) im Forschungslabor der Universitäts-Kinder- und Jugendklinik Rostok. Die trockenen Proben wurden zu 0,5 - 1 mg mittels einer Spiralfederwaage in Zinnschiffchen eingewogen, welche anschließend fest verschlossen wurden. Das Prinzip der Massenspektrometrie besteht darin, dass eine Probe verdampft und ionisiert wird. Die Ionen werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt und so aus der Ionenquelle entfernt. Verschieden schwere Ionen, z. B. ^{12}C und ^{13}C , unterscheiden sich in ihrer Geschwindigkeit. Die aus der Ionenquelle austretenden Ionen werden in einem dünnen Strahl gebündelt und in den Analysator geleitet, wo sie in einem Magnetfeld, abhän-

gig von ihrer Masse und Geschwindigkeit, abgelenkt werden. Die Ionen des so aufgetrennten Strahls gelangen zu verschiedenen Teilen der Detektoreinheit, wo sie in Faraday'schen Käfigen eingefangen und in ein elektrisches Signal umgewandelt werden, welches proportional zur Anzahl der auftreffenden Ionen ansteigt. Über eine Sensoreinheit kann der gemessene Stromfluss der computergestützten Datenanalyse zugänglich gemacht und das Isotopenverhältnis in der Probe bestimmt werden.

Die Berechnung des ^{13}C -Massenüberschusses ($^{13}\text{C excess}$) erfolgt adäquat zum Vorgehen bei ^{15}N (siehe 3.7.2) nach Gleichung 3.12. Zur Berechnung des ^{13}C -Überschusses [Atom-%] in den Proben wurde Harnstoff als Standard verwendet (1,06531 Atom-% ^{13}C). Die Isotopenzusammensetzung des Harnstoffs entspricht nicht exakt der natürlichen Isotopenzusammensetzung des Kohlenstoffs in der Umwelt, schafft jedoch eine einheitliche Bezugsbasis wodurch verschiedene Messwerte vergleichbar werden.

$$Masse^{13}\text{C}_{Probe} = \frac{13 * Atom-\%^{13}\text{C}_{excess} * Masse\text{C}_{Probe}}{1200 + Atom-\%^{13}\text{C}_{excess}} \quad 3.12$$

3.8 Statistik

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mittels der Software IBM SPSS 17.0 für Windows.

Ausreißerentfernung

Die Überprüfung der Daten auf Ausreißer erfolgte visuell mittels Boxplots. Es wurden nur gesamte Pflanzen und Proben, bei welchen nachweislich ein Analysenfehler auftrat ausgeschlossen. Verhielt sich beispielsweise die Blattfraktion einer Pflanze hinsichtlich der N-Menge als Ausreißer, so wurde anschließend überprüft, wie sich dieser Parameter bei den summierten Daten aus Blättern und Sprossachse verhält. Zeigte sich bei diesen keine Auffälligkeit, so wurde davon ausgegangen, dass die Abweichung durch die natürliche biologische Variabilität bedingt ist. Die betreffende Pflanze unterscheidet sich insgesamt aber nicht von den anderen und daher werden alle Daten dieser Probenpflanze beibehalten. Dieses Vorgehen ist zudem durch die z. T. geringen

Stichprobenumfänge von $n = 4$ begründet, durch welche ein Datenpunkt eventuell als Ausreißer gekennzeichnet wird, wenn die übrigen Datenpunkte an anderer Stelle der Normalverteilung zufällig eng beieinander liegen.

Varianzanalyse

Zur Untersuchung, ob signifikante Unterschiede zwischen den Faktorstufen (k) vorlagen, wurden einfaktorielle Varianzanalysen (ANOVA, analysis of variances) durchgeführt. Das Prinzip der ANOVA besteht in der Zerlegung der Gesamtvariabilität der Messdaten in die Variabilität, welche durch den untersuchten Faktor verursacht wird und in jene, die durch alle nicht untersuchten Faktoren verursacht wird, die sog. Reststreuung oder Zufallsvariabilität. Ist die Streuung zwischen den untersuchten Faktorstufen (feste Effekte) deutlich größer, als jene innerhalb einer Faktorstufe (Restvariabilität) so wird die Nullhypothese von der Gleichheit aller Gruppenmittelwerte ($H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$: „die Mittelwerte der Gruppen unterscheiden sich nicht“) fallen gelassen [77]. Wurden zwei Faktoren variiert erfolgte die Analyse mittels einer zweifaktoriellen ANOVA, um Interaktionseffekte der Faktoren zu überprüfen. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. Dies entspricht einer fünfprozentigen Wahrscheinlichkeit, dass H_0 abgelehnt wird, obwohl H_0 zutrifft. Zur Durchführung einer ANOVA müssen die Daten unabhängigen Stichproben entstammen, der Normalverteilung entsprechen und die Varianzen der untersuchten Stichproben dürfen sich nicht signifikant unterscheiden.

Prüfung auf Normalverteilung

Eine Voraussetzung für die Durchführung einer ANOVA ist die Normalverteilung der Daten. Der Test hierauf erfolgte mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests (K-S-Test). Aufgrund der relativ geringen Stichprobenumfänge ist dessen Ergebnis jedoch kritisch zu betrachten. Auch eine visuelle Überprüfung mittels eines Histogramms ist bei Stichproben mit wenigen Wiederholungen nur bedingt möglich. Sofern der K-S-Test nicht signifikant war, also die Nullhypothese, dass die Daten normalverteilt sind, beibehalten wird, wurde die ANOVA durchgeführt. In der Literatur wird zudem berichtet, dass die ANOVA stabil gegenüber der Verletzung der Normalverteilung ist [78].

Prüfung der Varianzhomogenität

Die Prüfung auf Homogenität der Varianzen erfolgte mittels des Levené-Tests, welcher keine Normalverteilung und Balanciertheit (gleiche Anzahl an Wiederholungen) der Daten erfordert [77].

Post Hoc Tests

Für den Fall, dass der Levené-Test nicht signifikant war ($p > 0,05$), d. h. Varianzhomogenität zwischen den Gruppen vorlag, wurde das Ergebnis der ANOVA angenommen. Als *Post Hoc* Test zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen untersuchten Gruppen (Faktorstufen) wurde der Tukey`s HSD (*Honestly Significant Difference*) Test durchgeführt. Ergab der Levené-Test jedoch, dass keine Varianzhomogenität vorlag ($p < 0,05$), wurde zunächst mittels des Welch-Tests die Gleichheit der Gruppenmittelwerte überprüft. Dieser Test setzt im Gegensatz zur ANOVA keine Gleichheit der Varianzen der Vergleichsgruppen voraus. Im Fall des Vergleichs von nur zwei Gruppen wurde das Ergebnis des Welch-Tests gewertet und bei mehr als zwei Gruppen erfolgte die Auswertung mittels des Dunnett-T3 *Post Hoc* Tests. In Fällen unbalancierter Stichproben kam der Scheffé-Test zum Einsatz, welcher keine identische Stichprobenanzahl in den Gruppen voraussetzt.

Angegebenes Streuungsmaß

Die in den Diagrammen dieser Arbeit dargestellten Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes (*SE, standard error, Gl. 3.13*). Der Standardfehler gibt die Standardabweichung des Mittelwertes einer Stichprobe vom Mittelwert des betreffenden Parameters in der Grundgesamtheit an und ermöglicht somit eine Aussage zur Güte der Stichprobe.

$$SE = s / \sqrt{n} \quad 3.13$$

Somit wird die Standardabweichung auf n normiert, was den Vorteil hat, dass sich die Streuung zweier Datensätze mit unterschiedlichem Stichprobenumfang, wie z. B. jene der Versuche aus den Jahren 2009 und 2010, besser vergleichen lässt. Der Parameter ist vom Stichprobenumfang und der Varianz in der Grundgesamtheit abhängig [77].

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen am Haupttrieb

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Untersuchungen in den Jahren 2009 und 2010 an den Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 berichtet. Der Schwerpunkt liegt dabei auf den Organen des Haupttriebes, für welche die Parameter Trockenmasse, C- und N-Menge (mg), ^{13}C - sowie der ^{15}N -Überschuss [μg] bestimmt wurden. Weiterhin wird auf die Proteinfractionen des Endosperms eingegangen, die über die Messgrößen ^{15}N und N beschrieben werden. Für alle Parameter wird anhand der Daten aus 2009 der Einfluss der Prüffaktoren Genotyp und Probenahmetermin untersucht. Anschließend werden die Werte aus dem Wiederholungsversuch 2010 jenen aus dem ersten Hauptversuch gegenübergestellt, um zu prüfen, ob beobachtete Effekte bestätigt werden können. Am Ende dieses Kapitels werden die Trockenmassedaten der Bestockungstriebe berichtet, um zu prüfen, inwieweit der Haupttrieb hinsichtlich dieser Größe repräsentativ für die Gesamtpflanze ist.

4.1.1 Vegetative Organe – Trockenmasseentwicklung

Die Trockenmasse ist von Bedeutung, da sie zum einen als zusammenfassende Größe Informationen über das Wachstumsverhalten der Pflanze gibt und zum anderen, weil sie als Bezugsgröße zur Berechnung der Massenanteile von C, N, ^{13}C und ^{15}N dient. In beiden Versuchsjahren wurden die Haupttriebe der Pflanzen in die Bestandteile Sprossachse, Blätter und Fahnenblatt separiert. Nicht enthalten sind die Bestandteile der Ähre (Ährenspindel, Spelzen). Da es bei der Bestimmung der C-, N- und Isotopenparameter zahlreiche Probenaussfälle bei den Fahnenblättern gab, werden sie auch bezüglich der Trockenmasse im ersten Hauptversuch nicht näher betrachtet. Bei der Gegenüberstellung der Versuchsjahre ist das Fahnenblatt jedoch enthalten, da die Blattproben 2010 als Mischproben aus Blättern und Fahnenblatt hinsichtlich C, N und Isotopen analysiert wurden.

Im ersten Hauptversuch 2009 wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen hinsichtlich der Trockenmassen der Sprossachsen und Blätter des Haupttriebes festgestellt (Abb. 8). Ebenso unterschied sich dieser

Parameter nicht zwischen den Probenahmeterminen für ein Organ eines Genotyps, mit Ausnahme der Sprossachse von Risø 13, deren Trockenmasse von 8 dpa zu 20 dpa signifikant anstieg. Auch die Fahnenblätter (nicht dargestellt) zeigten weder zwischen den Genotypen, noch zwischen den Probenahmeterminen deutliche Unterschiede. Deren Anteil an der Gesamt-Blatttrockenmasse betrug im Mittel aller Genotypen und Probenahmetermine (8, 14, 20 dpa) 11,6 %.

Der zweite Hauptversuch bestätigte, dass hinsichtlich der Trockenmasse der vegetativen Organe zu 20 dpa kein Einfluss des Faktors Genotyp besteht. Tendenziell lagen die Mittelwerte 2010, mit Ausnahme der Blattfraktion von Risø 13, unter jenen des Vorjahres, jedoch ist dieser beobachtete Unterschied nur für die Sprossachse von Risø 13 statistisch gesichert (Abb. 9).

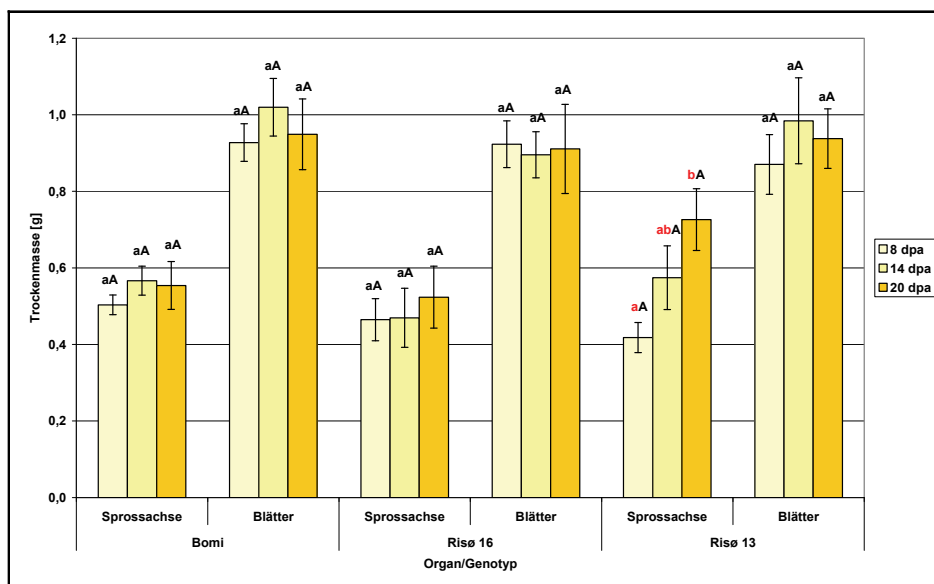


Abb. 8: Mittlere Trockenmassen [g] der vegetativen Organe des Haupttriebes für die Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 im ersten Hauptversuch 2009. Die Daten der Fahnenblätter sind nicht enthalten. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Probenahmetermine für ein Organ eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für ein Organ zu einem Probenahmetermin)

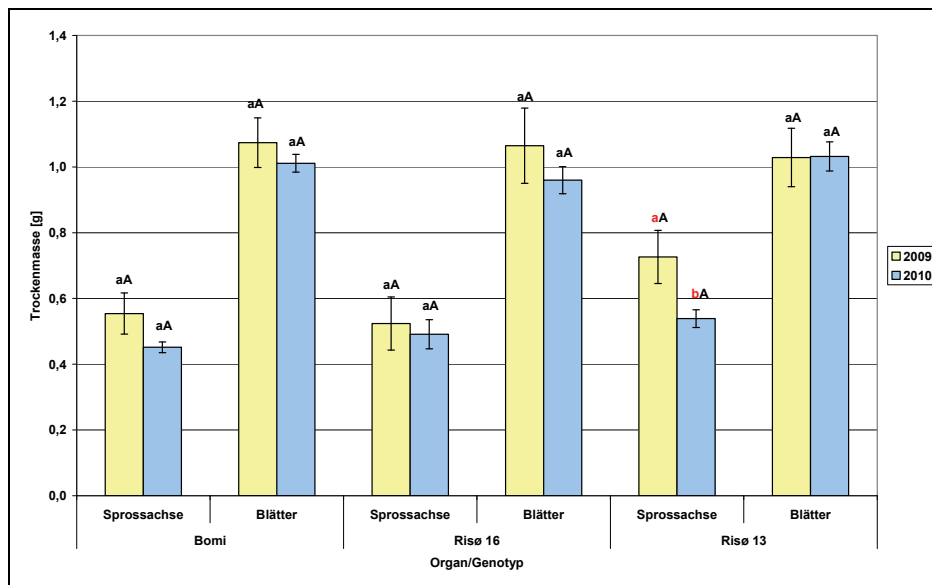


Abb. 9: Vergleich der mittleren Trockenmassen [g] der Sprossachsen und Blätter (inklusive Fahnenblatt) des Haupttriebes zu 20 dpa aus den Versuchsjahren 2009 und 2010. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Versuchsjahre für ein Organ eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für ein Organ und ein Versuchsjahr)

4.1.2 Vegetative Organe – Gesamt-C und ^{13}C -Anreicherung

Die C-Mengen und ^{13}C -Überschusswerte spiegeln zwei verschiedene Vorgänge wider. Während erste beschreiben, wieviel Kohlenstoff in der gesamten Entwicklung der Pflanze in dem entsprechenden Organ eingelagert wurde, zeigt der ^{13}C -Überschuss, wie der vier Tage vor Probenahme assimilierte Kohlenstoff in der Pflanze verlagert wurde.

Für die Kohlenstoffmenge (mg) in den vegetativen Organen des Haupttriebes aus dem ersten Hauptversuch 2009 zeigt sich ein sehr ähnliches Bild wie für die Trockenmasse. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Genotypen. Bei dem Vergleich der Beprobungstermine ist nur für die Sprossachse von Risø 13, analog zur Trockenmasse, ein Anstieg von 8 zu 20 Tagen nach Anthese nachweisbar. Alle weiteren Varianten zeigen diesbezüglich keine statistisch gesicherten Unterschiede (Abb. 10). Tendenziell niedrigere Werte in den Blättern von 'Bomi' zu 14 dpa sind sehr wahrscheinlich auf einen Analysefehler bei dieser Probencharge zurückzuführen.

Im Versuchsjahr 2010 war die C-Menge in der Sprossachse zu 20 dpa bei Risø 13 im Vergleich zu 'Bomi' signifikant erhöht. Dieser Unterschied bestand bereits 2009, konnte jedoch nicht statistisch abgesichert werden. Im Vergleich mit dem Vorjahr enthielten die Sprossachsen bei allen Genotypen absolut weniger Kohlenstoff, jedoch nur im Fall von Risø 13 war dieser Unterschied signifikant (Abb. 11). Für die Blattfraktion, bei welcher keine Unterschiede zwischen den Genotypen feststellbar waren, wurden die Ergebnisse aus 2009 bestätigt (Tab. 4).

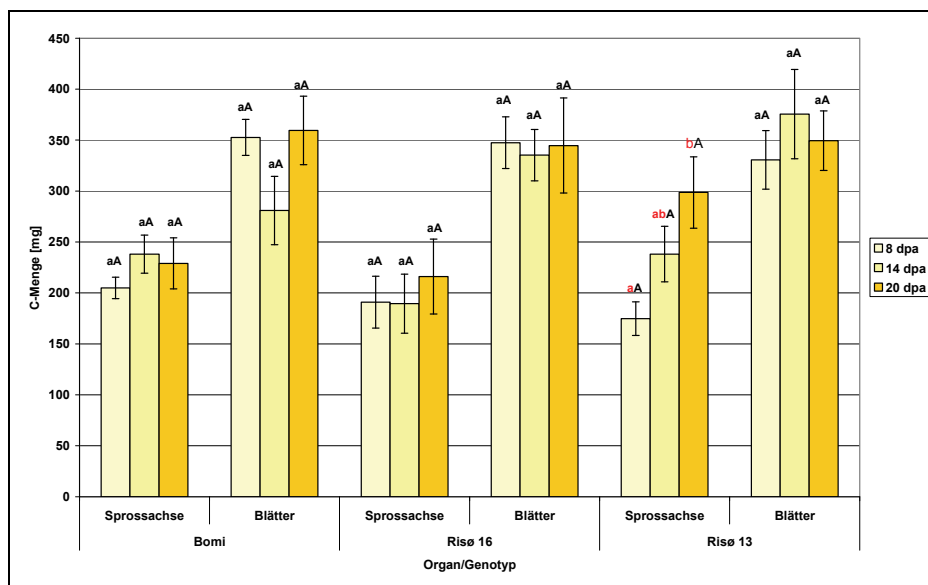


Abb. 10: C-Mengen [mg] in den vegetativen Organen des Haupttriebes der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 im ersten Hauptversuch 2009. Die Daten der Fahnenblätter sind nicht enthalten. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Probenahmetermine für ein Organ eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für ein Organ zu einem Probenahmetermin)

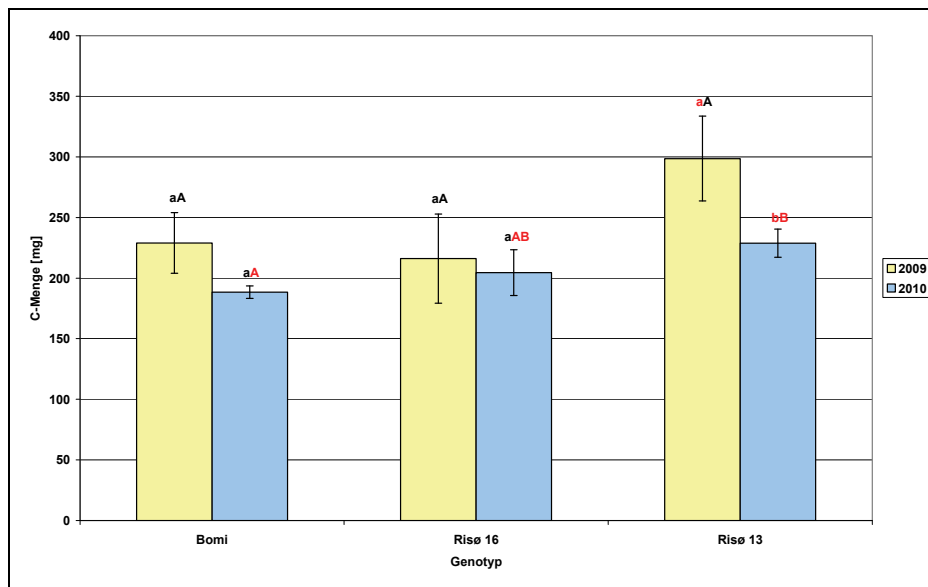


Abb. 11: Vergleich der C-Menge [mg] in den Sprossachsen der Haupttriebe zu 20 dpa aus den Versuchsjahren 2009 und 2010. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Versuchsjahre je Genotyp, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für ein Versuchsjahr)

Tab. 4: Mittlere C-Mengen [mg] und C-Trockenmasseanteile [% TM] (\pm SE) in den Blättern (inklusive Fahnenblatt) des Haupttriebes der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 im zweiten Hauptversuch 2010. (Homogene Gruppen: Vergleich der Genotypen)

Genotyp	C-Menge [mg]	C-Massenanteil [% TM]
'Bomi'	379,7 \pm 13,5 ^A	37,6 \pm 0,4 ^A
Risø 16	370,2 \pm 15,9 ^A	38,6 \pm 0,1 ^A
Risø 13	397,3 \pm 13,5 ^A	38,6 \pm 0,4 ^A

Der Kohlenstoffmassenanteil ist das Verhältnis der bestimmten C-Menge zur Trockenmasse des betrachteten Organs und beschreibt somit Veränderungen in der stofflichen Zusammensetzung. Wie aus Abb. 12 ersichtlich, bestehen auch beim C-Massenanteil in den Blättern und Sprossachsen aus dem ersten Hauptversuch (2009) nahezu keine Unterschiede zwischen den Genotypen. Das trifft auch für die Beprobungstermine zu. Einzig die Blätter des Wildtyps 'Bomi' zeigen zu 14 dpa einen signifikant niedrigeren C-Massenanteil, sowohl im Vergleich mit den Beprobungsterminen 8 und 20 dpa als auch gegenüber den Mutanten zu 14 dpa. Wie zuvor erwähnt, ist dies wahrscheinlich durch

einen Analysefehler bei der Bestimmung der C-Mengen begründet. Die C-Massenanteile in den Blättern sind bei allen Genotypen und allen Terminen gegenüber der Sprossachse etwas niedriger.

Der Vergleich der C-Massenanteile in der Sprossachse zu 20 dpa zwischen den Versuchsjahren 2009 und 2010 ergibt für 'Bomi' und Risø 16 tendenziell höhere Werte in letzterem. Am stärksten und signifikant ist der beobachtete Unterschied bei Risø 13 (Abb. 13). Zwischen den Genotypen bestanden 2010 keine Unterschiede hinsichtlich der C-Massenanteile in der Sprossachse und den Blättern (Mittelwerte in Tab. 4).

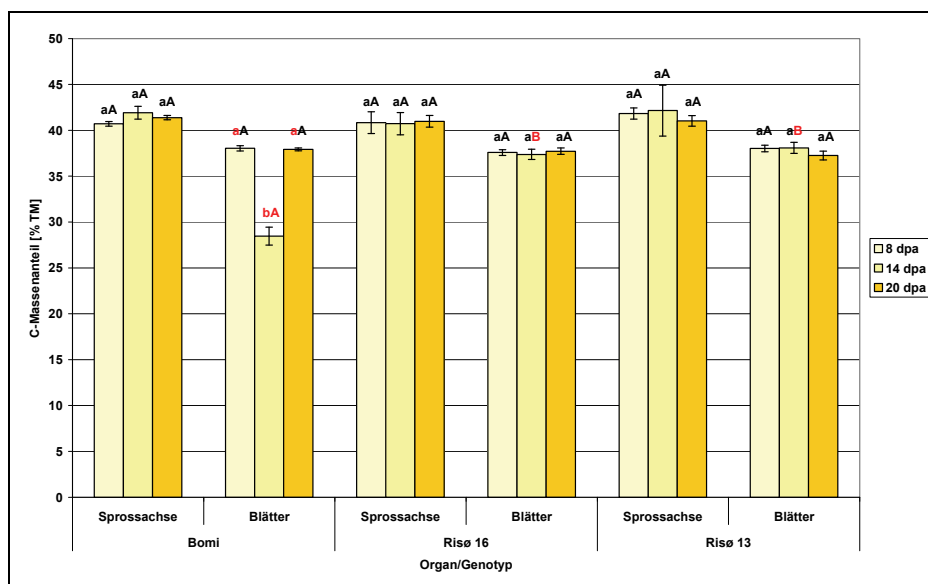


Abb. 12: C-Massenanteile in den vegetativen Organen des Haupttriebes der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 im ersten Hauptversuch 2009. Die Daten der Fahnenblätter sind nicht enthalten. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Probenahmeterminen für ein Organ eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für ein Organ zu einem Probenahmetermin)

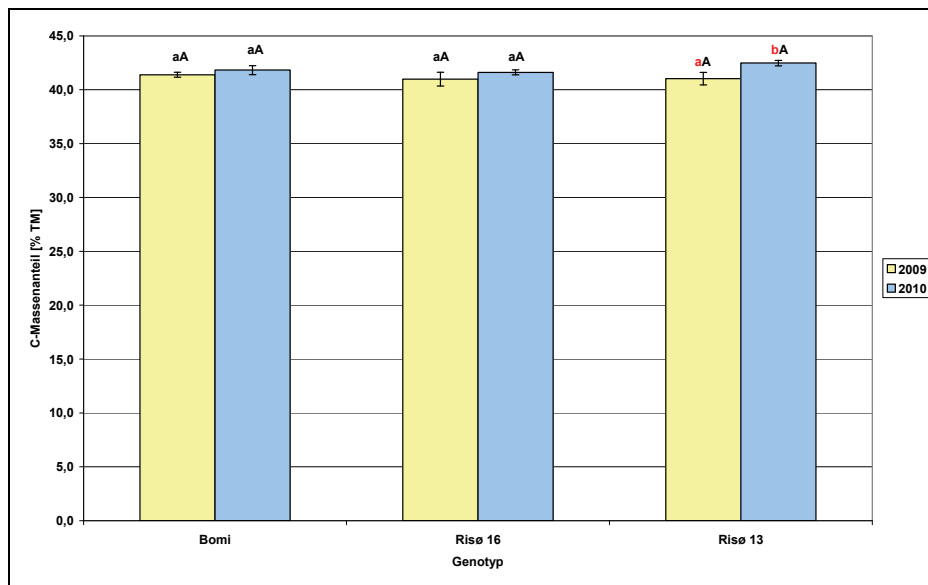


Abb. 13: Vergleich der C-Massenanteile [% TM] in den Sprossachsen der Haupttriebe zu 20 dpa aus den Versuchsjahren 2009 und 2010. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Versuchsjahre je Genotyp, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für ein Versuchsjahr)

Der ^{13}C -Überschuss [μg] repräsentiert die Verteilung des vier Tage vor Probenahme assimilierten Kohlenstoffs in der Pflanze. Die Werte aus dem ersten Hauptversuch (2009) für die Sprossachsen und Blätter sind in Abb. 14 dargestellt. Die mit einem Stern markierten Varianten kennzeichnen Stichproben mit weniger als drei Wiederholungen (Probenauffälle), welche nicht in die statistische Auswertung einbezogen wurden. Für den Prüffaktor Probenahmetermin konnte nur in einem Fall, der Sprossachse von 'Bomi' zu 8 und 20 dpa, ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Es besteht jedoch bei allen drei Genotypen die Tendenz, dass der ^{13}C -Überschuss in der Sprossachse zu 8 dpa am geringsten ist, zu 14 dpa ansteigt und sich von 14 zu 20 dpa nur geringfügig ändert. Ein Unterschied zwischen den Genotypen konnte 2009 nicht nachgewiesen werden. Vergleicht man die Organfraktionen Blätter und Sprossachse, so zeigt sich, dass zu 8 dpa die Werte bei allen Genotypen in den Blättern im Vergleich zur Sprossachse signifikant höher waren. Für die übrigen Zeitpunkte wurde kein gesicherter Unterschied festgestellt, jedoch bestand auch hier der gleiche Trend.

Die Ergebnisse des zweiten Hauptversuches decken sich mit jenen des Vorjahres zum Zeitpunkt 20 dpa. Auch hier konnte kein Einfluss des Faktors Genotyp

auf den ^{13}C -Überschuss in den Sprossachsen (Abb. 15) und Blättern (Tab. 5) festgestellt werden. Die Werte in den Blättern lagen bei 'Bomi' und Risø 13 signifikant, bei Risø 16 tendenziell höher (p-Wert ANOVA: 0,054) als in den Sprossachsen. Dies bekräftigt die im Vorjahr (2009) beobachteten Tendenzen zu 20 dpa. Wie in Abb. 15 dargestellt, enthielten die Sprossachsen von 'Bomi' und Risø 13 zu 20 dpa im zweiten Hauptversuch (2010) weniger ^{13}C als im ersten (2009). Für Risø 16 bestand diesbezüglich kein Unterschied.

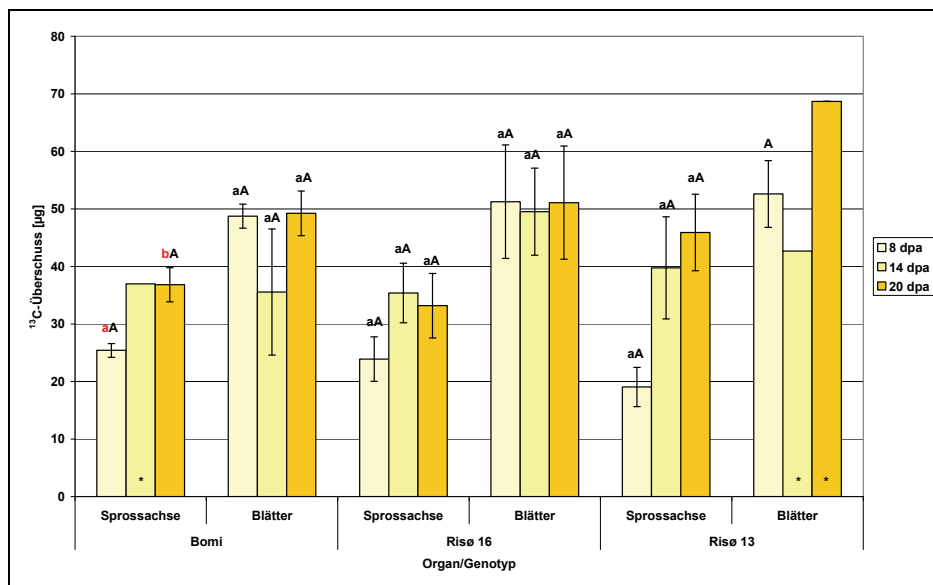


Abb. 14: ^{13}C -Überschuss [μg] in den vegetativen Organen des Haupttriebes der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 im ersten Hauptversuch 2009. Die Daten der Fahnenblätter sind nicht enthalten. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Probenahmetermine für ein Organ eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für ein Organ zu einem Probenahmetermin; markierte Balken (*) mit Stichprobenumfang $n < 3$)

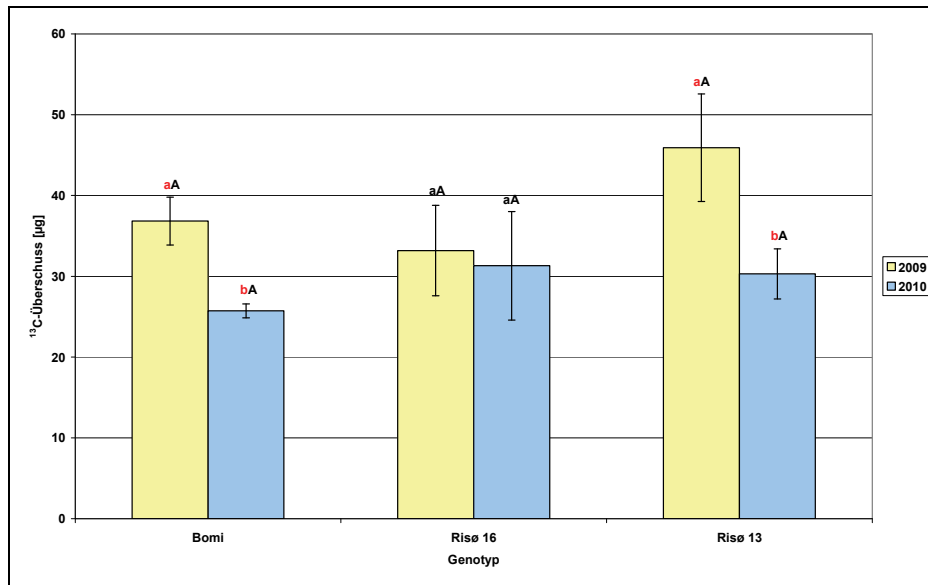


Abb. 15: Vergleich des ^{13}C -Überschusses [µg] in den Sprossachsen der Haupttriebe zu 20 dpa aus den Versuchsjahren 2009 und 2010. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Versuchsjahre je Genotyp, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen je Versuchsjahr)

Tab. 5: Mittlerer ^{13}C -Überschuss [µg] und ^{13}C -Trockenmasseanteil [µg ^{13}C * g⁻¹ TM] (± SE) in den Blättern des Haupttriebes 2009 (exklusive Fahnenblatt) und 2010 (inklusive Fahnenblatt) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13. (Homogene Gruppen: Vergleich der Genotypen für ein Versuchsjahr)

Genotyp	^{13}C -Überschuss [µg]		^{13}C -Massenanteil [µg ^{13}C * g ⁻¹ TM]	
	2009	2010	2009	2010
'Bomi'	49,24 ± 3,88 A	50,98 ± 1,63 A	52,18 ± 1,78 A	50,38 ± 0,49 A
Risø 16	51,10 ± 9,85 A	50,66 ± 4,56 A	52,57 ± 4,95 A	52,97 ± 1,83 A
Risø 13	68,7 (n = 1 !)	47,08 ± 3,66 A	62,08 (n = 1 !)	46,19 ± 4,08 A

Für den ^{13}C -Massenanteil an der Trockenmasse der vegetativen Organe wurde wie auch für den ^{13}C -Überschuss zu keinem Beprobungstermin ein Einfluss des Prüffaktors Genotyp nachgewiesen (Abb. 16). Beim Vergleich der Beprobungstermine 2009 konnte nur für die Sprossachse von Risø 16 ein deutlicher

Anstieg zwischen 8 und 14 dpa festgestellt werden. Tendenziell, war dies jedoch auch bei 'Bomi' und Risø 13 zu beobachten.

Der Versuch 2010 bestätigte, dass zum Termin 20 dpa kein Unterschied zwischen den Genotypen bezüglich der ^{13}C -Massenanteile in Blättern (nicht dargestellt) und Sprossachsen besteht (Abb. 17). Der Massenanteil in den Blättern war bei 'Bomi' niedriger als in der Sprossachse, während für die anderen Genotypen kein solcher Unterschied nachgewiesen werden konnte (nicht dargestellt). Der Vergleich der ^{13}C -Massenanteile in der Sprossachse zu 20 dpa in den Jahren 2009 und 2010, zeigt die Tendenz zu niedrigeren Werten im zweiten Versuchsjahr (Abb. 17), jedoch sind diese Unterschiede statistisch nicht zu sichern, was die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Markierungsmethode belegt.

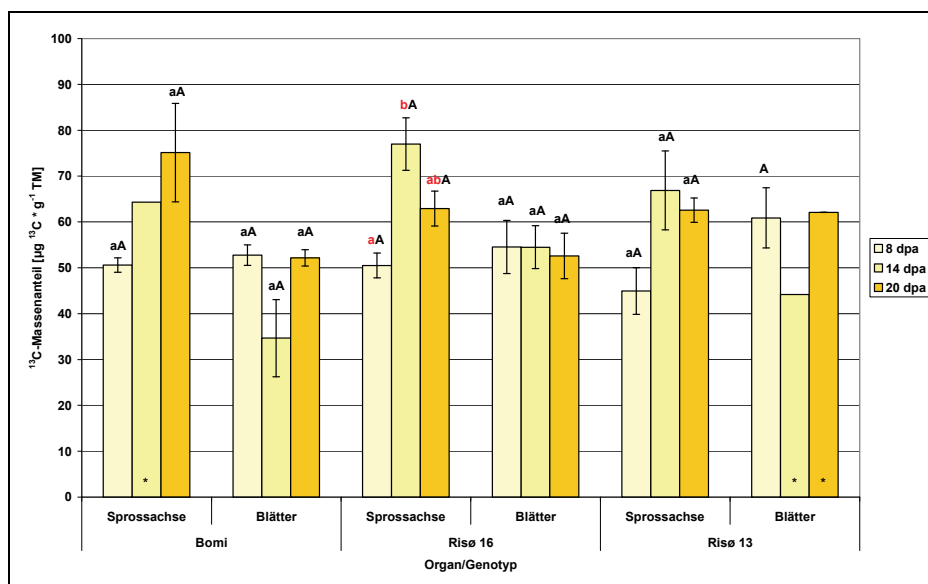


Abb. 16: ^{13}C -Trockenmasseanteil [$\mu\text{g } ^{13}\text{C} * \text{g}^{-1} \text{ TM}$] in den vegetativen Organen des Haupttriebes der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 im ersten Hauptversuch 2009. Die Daten der Fahnenblätter sind nicht enthalten. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Probenahmetermine für ein Organ eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für ein Organ zu einem Probenahmetermin; markierte Balken (*) mit Stichprobenumfang $n < 3$)

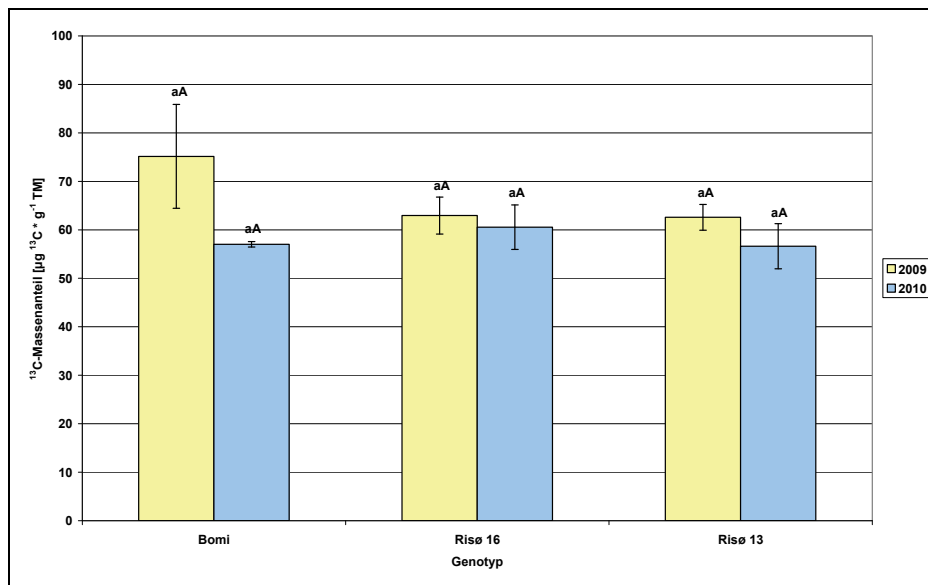


Abb. 17: Vergleich der ^{13}C -Trockenmasseanteile [$\mu\text{g } ^{13}\text{C} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TM}$] in den Sprossachsen der Haupttriebe zu 20 dpa aus den Versuchsjahren 2009 und 2010. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Versuchsjahre je Genotyp, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen je Versuchsjahr)

4.1.3 Vegetative Organe – Gesamt-N und ^{15}N -Anreicherung

Wie für den Kohlenstoff gilt auch beim Stickstoff, dass die Gesamt-Stickstoffwerte das Ergebnis der Summe aller Prozesse in der Pflanzenentwicklung bis zur Probenahme widerspiegeln, während der ^{15}N -Überschuss die Aufnahme und Verlagerung des Stickstoffs im Zeitraum von vier Tagen vor Probenahme beschreibt.

Die Gesamt-Stickstoffmenge in den vegetativen Organen aus dem ersten Hauptversuch nahm sowohl in den Blättern, als auch den Sprossachsen (Abb. 18) bei den Genotypen 'Bomi' und Risø 16 von 8 dpa zu 20 dpa ab. Der Unterschied der Mittelwerte war im Fall der Sprossachse von 'Bomi' und den Blättern von Risø 16 signifikant. Bei Risø 13 bestand hingegen der Trend zu steigenden Mengen in beiden Organen. Ein Einfluss des Prüffaktors Genotyp wurde beim Vergleich der N-Mengen für die Blätter und Sprossachsen zu den drei Beprobungsterminen nicht festgestellt.

Auch 2010 unterschieden sich die Genotypen hinsichtlich der N-Menge in den Sprossachsen zu 20 dpa nicht voneinander. Im Vergleich zum Vorjahr war diese jedoch bei den Mutanten deutlich und bei 'Bomi' tendenziell niedriger

(Abb. 19). Besonders stark fiel die Abnahme in der Sprossachse von Risø 13 mit einer mittleren Verringerung um 65 % aus. Für die Blattfraktionen wurde ebenfalls das Ergebnis des ersten Hauptversuches, dass kein Unterschied zwischen den Genotypen hinsichtlich der N-Menge zu 20 dpa besteht, reproduziert. Ein Vergleich der Versuchsjahre ist nur bedingt möglich, da die Blattproben 2010 im Gegensatz zu 2009 das Fahnenblatt enthielten. Die Gegenüberstellung der Werte zeigt jedoch, dass die N-Mengen 2010 zumindest tendenziell auch in den Blättern geringer ausfielen (Tab. 6) und auch hier in besonderem Maße bei Risø 13.

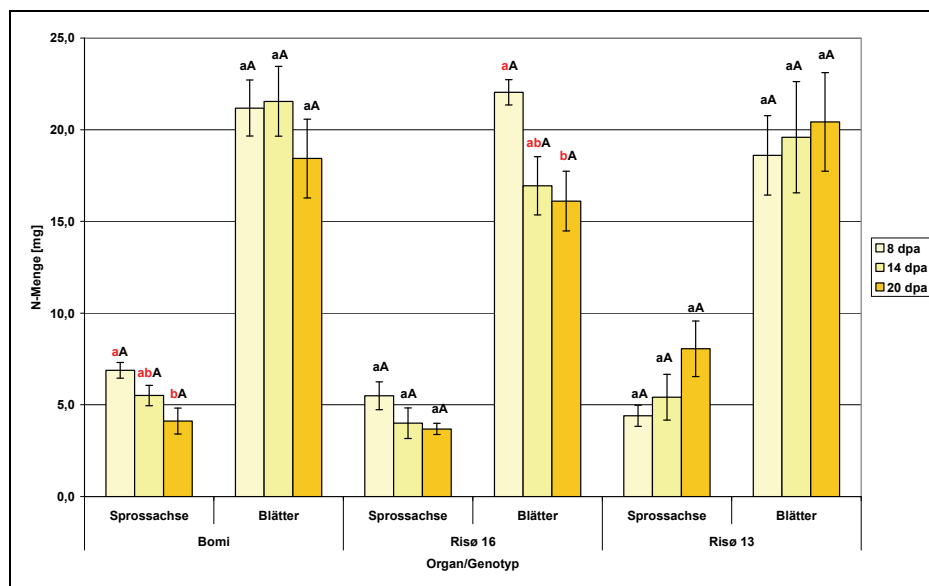


Abb. 18: N-Menge [mg] in den vegetativen Organen des Haupttriebes der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 im ersten Hauptversuch 2009. Die Daten der Fahnenblätter sind nicht enthalten. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Probenahmetermine für ein Organ eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für ein Organ zu einem Probenahmetermin)

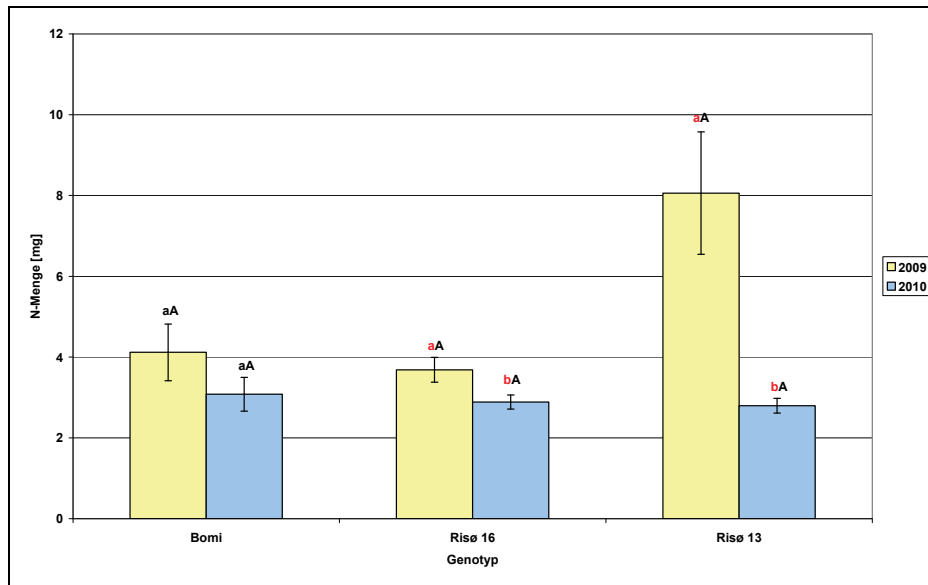


Abb. 19: Vergleich der N-Menge [mg] in den Sprossachsen der Haupttriebe zu 20 dpa aus den Versuchsjahren 2009 und 2010. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Versuchsjahre je Genotyp, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für ein Versuchsjahr)

Tab. 6: Mittlere N-Menge [mg] und N-Massenanteil [% TM] (\pm SE) in den Blättern des Haupttriebes 2009 (exklusive Fahnenblatt) und 2010 (inklusive Fahnenblatt) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13. (Homogene Gruppen: Vergleich der Genotypen für ein Versuchsjahr)

Genotyp	N-Menge [mg]		N-Massenanteil [% TM]	
	2009	2010	2009	2010
'Bomi'	18,43 \pm 2,15 ^A	17,45 \pm 1,06 ^A	1,93 \pm 0,05 ^A	1,72 \pm 0,06 ^A
Risø 16	16,11 \pm 1,63 ^A	15,98 \pm 1,23 ^A	1,79 \pm 0,09 ^A	1,66 \pm 0,08 ^A
Risø 13	20,42 \pm 2,68 ^A	16,46 \pm 0,90 ^A	2,16 \pm 0,15 ^A	1,60 \pm 0,07 ^A

Die Daten der N-Massenanteile an der Trockenmasse der vegetativen Organe aus dem ersten Hauptversuch komplettieren das Bild, welches sich mit den Kohlenstoff- und Stickstoffmengen ergibt. Zu keinem Beprobungstermin wurde ein Einfluss des Prüffaktors Genotyp nachgewiesen. Bei 'Bomi' und Risø 16 nahmen die N-Massenanteile in den Blättern sowie den Sprossachsen von 8 zu 20 dpa ab, während er bei Risø 13 zu allen Beprobungsterminen konstant blieb (Abb. 20). Dem gegenüber stehen konstante C-Mengen in den Sprossachsen und Blättern von 'Bomi' und Risø 16, während die N-Mengen

in diesen Fällen (zumindest tendenziell) abnehmen. Bei Risø 13 hingegen stiegen die C- und N-Mengen, obgleich nicht immer signifikant, in der Sprossachse stark und in den Blättern wenig an.

Der Vergleich der Hauptversuche eins und zwei bezüglich der N-Massenanteile in der Sprossachse zu 20 dpa offenbart eine schwache, tendenzielle Verringerung bei 'Bomi' und Risø 16 sowie eine signifikante Absenkung (- 53 %) im Fall von Risø 13 (Abb. 21). Dieser Zusammenhang besteht als Trend auch für die Blattfraktion (Tab. 6) und in besonderem Maße auch hier für Risø 13. Zwischen den Genotypen bestanden 2010 wie bereits 2009 keine nachweisbaren Unterschiede hinsichtlich der N-Massenanteile in den vegetativen Organen zu 20 dpa.

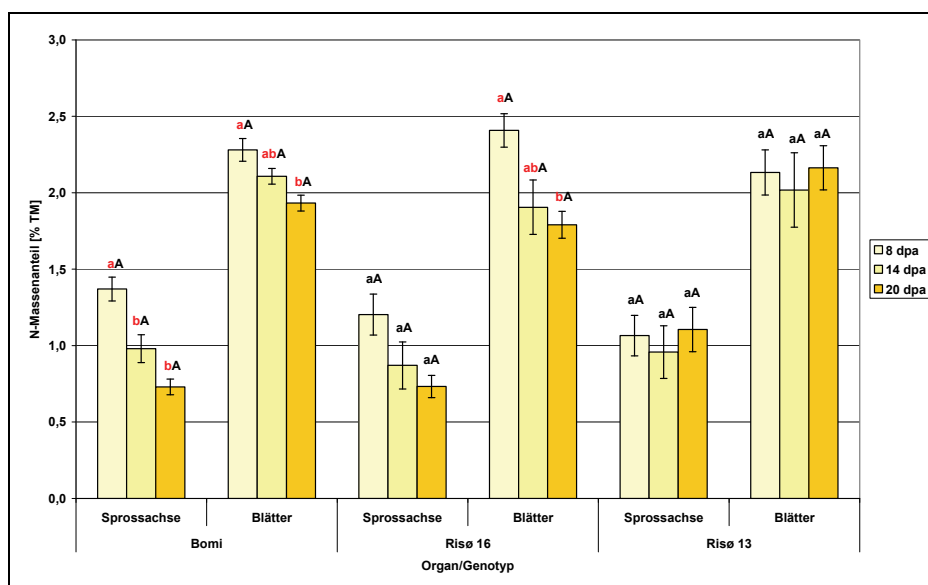


Abb. 20: N-Massenanteile [% TM] in den vegetativen Organen des Haupttriebes der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 im ersten Hauptversuch 2009. Die Daten der Fahnenblätter sind nicht enthalten. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Probenahmetermine für ein Organ eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für ein Organ zu einem Probenahmetermin)

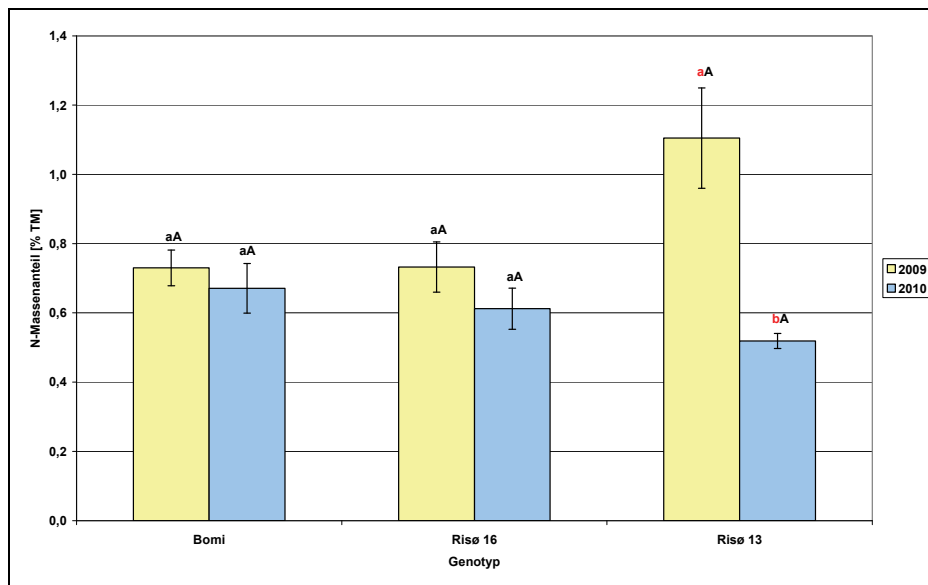


Abb. 21: Vergleich der N-Massenanteile [% TM] in den Sprossachsen der Haupttriebe zu 20 dpa aus den Versuchsjahren 2009 und 2010. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Versuchsjahre je Genotyp, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für ein Versuchsjahr)

Der ^{15}N -Überschuss in den vegetativen Organen zeigte 2009 in den meisten Fällen den gleichen Verlauf von 8 zu 20 dpa wie die N-Menge (Abb. 22). Abweichungen traten bei der Sprossachse von Risø 16 und den Blättern von Risø 13 auf (vgl. Abb. 18). Ein signifikanter Einfluss des Prüffaktors Probenahmetermin wurde jedoch nur für die Sprossachse von Risø 13 festgestellt. In diesem Fall kam es zu einer Zunahme von 8 zu 20 dpa. Bei der Sprossachse von 'Bomi' und der Blattfraktion aller drei Genotypen kam es hingegen zu einer tendenziellen Verringerung des mittleren ^{15}N -Überschusses von 8 zu 20 dpa. Ein Unterschied zwischen den Genotypen bestand in diesem Versuch nur zwischen den Sprossachsen zu 20 dpa, wobei der Mittelwert von Risø 13 um 88,7 % bzw. 74,6 % höher lag als jener von 'Bomi' und Risø 16 (Abb. 22).

Im Wiederholungsversuch wurde bezüglich des ^{15}N in den Sprossachsen zu 20 dpa kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen nachgewiesen, jedoch bestand auch 2010 die Tendenz zu einem höheren Wert bei Risø 13 (Abb. 23). Der ^{15}N -Überschuss in den Blättern zeigte in beiden Versuchen keine Beeinflussung durch den Prüffaktor Genotyp (Tab. 7). Der Vergleich von Hauptversuch eins und zwei für den Termin 20 dpa zeigt einen Trend zu nied-

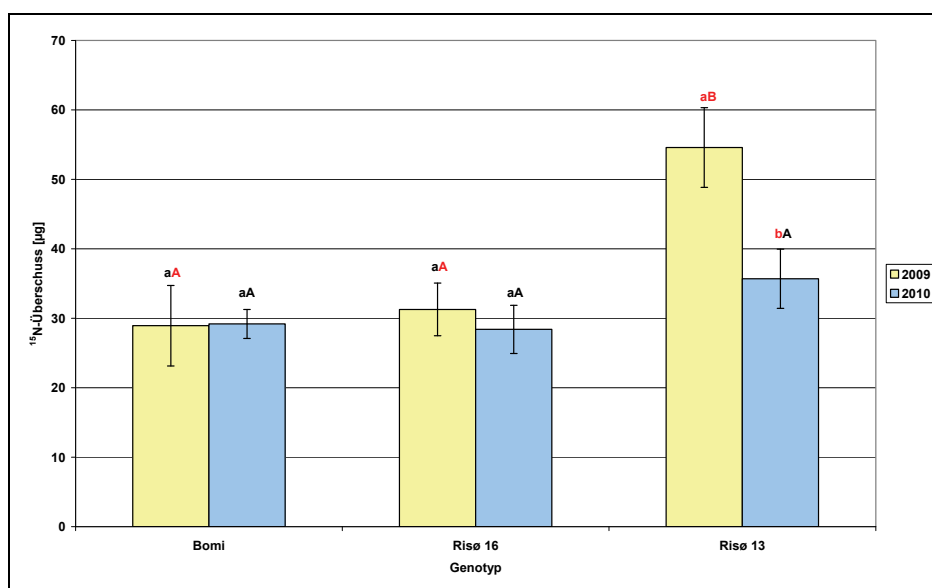


Abb. 23: Vergleich des ^{15}N -Überschusses [µg] in den Sprossachsen der Haupttriebe zu 20 dpa aus den Versuchsjahren 2009 und 2010. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Versuchsjahre je Genotyp)

Tab. 7: Mittlerer ^{15}N -Überschuss [µg] und ^{15}N -Trockenmasseanteil [µg ^{15}N * g⁻¹ TM] (± SE) in den Blättern des Haupttriebes 2009 (exklusive Fahnenblatt) und 2010 (inklusive Fahnenblatt) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 20 dpa. (Homogene Gruppen: Vergleich der Genotypen für ein Versuchsjahr)

Genotyp	^{15}N -Überschuss [µg]		^{15}N -Massenanteil [µg ^{15}N * g ⁻¹ TM]	
	2009	2010	2009	2010
'Bomi'	30,3 ± 10,8 ^A	19,3 ± 3,5 ^A	29,9 ± 7,4 ^A	18,7 ± 2,9 ^A
Risø 16	34,3 ± 11,3 ^A	28,4 ± 6,6 ^A	36,1 ± 10,1 ^A	28,4 ± 5,8 ^A
Risø 13	27,1 ± 4,8 ^A	36,6 ± 10,2 ^A	28,4 ± 3,0 ^A	35,9 ± 10,5 ^A

Der ^{15}N -Massenanteil in den vegetativen Organen 2009 (Abb. 24) folgt im zeitlichen Verlauf in allen Fällen dem ^{15}N -Überschuss, wodurch sich für beide Parameter ein sehr ähnliches Bild ergibt. Das Verhältnis von Sprossachse zu Blättern verschiebt sich jedoch. Während der ^{15}N -Überschuss im Mittel aller Termine, zumindest bei 'Bomi' und Risø 16, in den Blättern höher war, besteht bei allen Genotypen der Trend zu einem höheren Massenanteil an der Trockenmasse in der Sprossachse. Dies erklärt sich durch den Verdünnungseffekt (vgl. Abb. 18).

Zwischen den Genotypen konnte bezüglich des ^{15}N -Massenanteils in den vegetativen Organen 2009 zu keinem Beprobungstermin ein Unterschied festgestellt werden. Das gleiche trifft für die Wiederholung für 20 dpa im Jahr 2010 zu (Abb. 25, Tab. 7).

Ein Einfluss des Beprobungstermins wurde 2009 nur in einem Fall, der Blattfraktion von Risø 13, gesichert nachgewiesen. Hier kam es zu einer Abnahme des Massenanteils von 8 dpa zu 20 dpa, wobei zwischen 8 und 14 dpa kein Unterschied bestand. Für beide Organfraktionen des Genotyps 'Bomi' sowie der Blattfraktion von Risø 16 wurde tendenziell ebenfalls eine Abnahme von 8 zu 20 dpa bestimmt. Bei der Sprossachse von Risø 13 bestand hingegen der Trend zu steigenden Mittelwerten von 8 zu 20 dpa (Abb. 24).

Die Gegenüberstellung der ^{15}N -Massenanteile in den Sprossachsen zu 20 dpa aus den Versuchsjahren 2009 und 2010 zeigt, dass es bei 'Bomi' zu einer signifikanten Zunahme kam, während bei den Mutanten eine tendenzielle Abnahme zu verzeichnen war (Abb. 25). Bei den Blattfraktionen, welche nicht direkt vergleichbar sind, besteht hingegen die Tendenz, dass der ^{15}N -Massenanteil bei 'Bomi' und Risø 16 ab- und bei Risø 13 zunahm (Tab. 7).

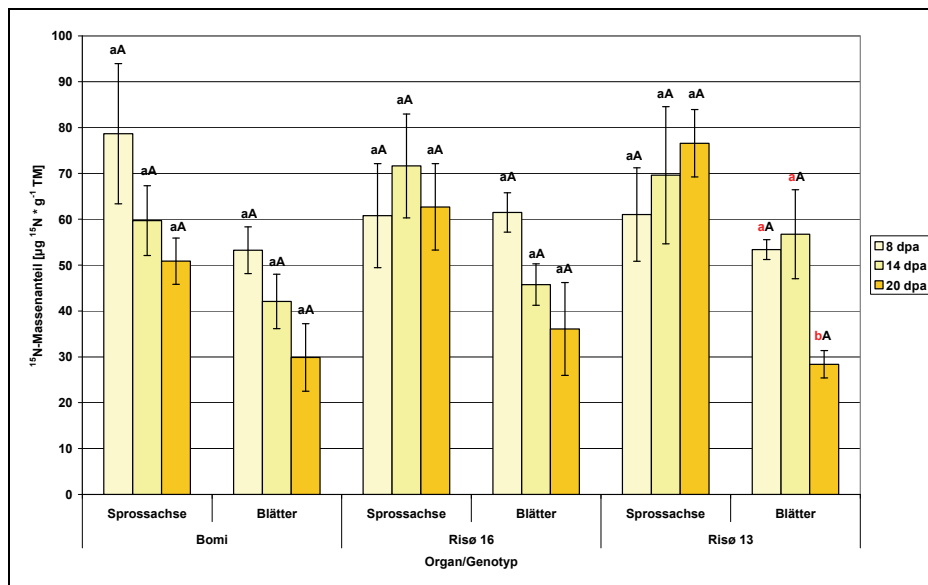


Abb. 24: ^{15}N -Trockenmasseanteil [$\mu\text{g } ^{15}\text{N} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TM}$] in den vegetativen Organen des Haupttriebes der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 im ersten Hauptversuch 2009. Die Daten der Fahnenblätter sind nicht enthalten. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Probenahmetermine für ein Organ eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für ein Organ zu einem Probenahmetermin)

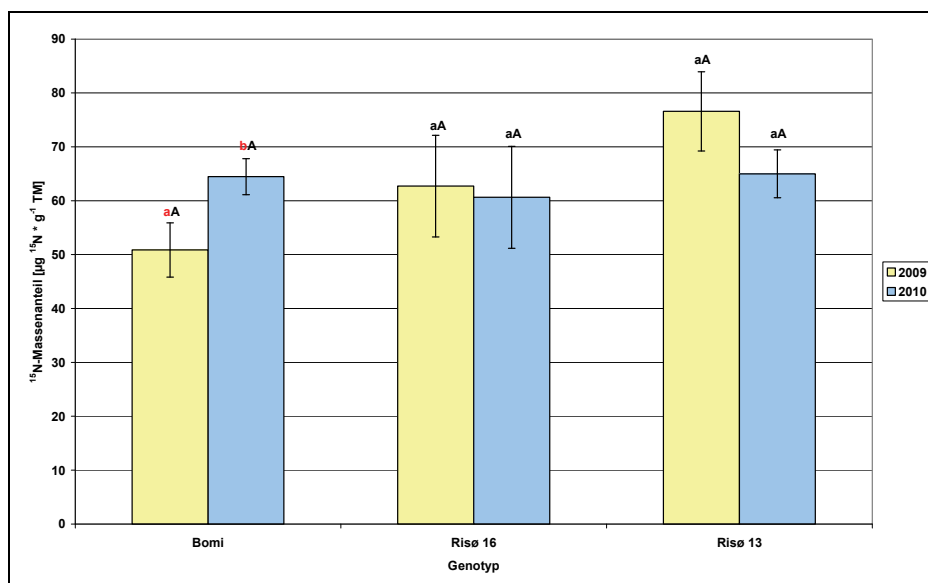


Abb. 25: Vergleich der ^{15}N -Trockenmasseanteile [$\mu\text{g } ^{15}\text{N} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TM}$] in den Sprossachsen der Haupttriebe zu 20 dpa aus den Versuchsjahren 2009 und 2010. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Versuchsjahre je Genotyp, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen je Versuchsjahr)

4.1.4 Endosperm – Frisch- und Trockenmasse

Das Endosperm ist von zentraler Bedeutung für diese Arbeit. In ihm findet die Stärkesynthese statt, welche bei den verwendeten Mutanten gestört ist. Für das Gesamtendosperm wurden die Parameter Frisch- und Trockenmasse, ^{13}C -Anreicherung (Atom-%), ^{15}N -Überschuss [μg] sowie N-Menge [mg] bestimmt.

Die Frisch- und Trockenmasse der Endosperme des Haupttriebes stiegen im ersten Hauptversuch bei allen Genotypen zwischen den Probenahmeterminen 8, 14 und 20 dpa linear an (Abb. 26, Abb. 27). Hinsichtlich der Frischmasse wurde 2009 kein Einfluss des Prüffaktors Genotyp zu den einzelnen Beprobungsterminen festgestellt, jedoch ergab eine zweifaktorielle Varianzanalyse, dass über alle drei Termine hinweg ein solcher Effekt auftrat (nicht dargestellt). Dabei gehören 'Bomi' und Risø 13 verschiedenen homogenen Gruppen an, während Risø 16 sich von keinem der anderen Genotypen unterscheidet.

Bezüglich der Trockenmasse wurden zu allen Terminen bei 'Bomi' die tendenziell höchsten Werte festgestellt und zu 20 dpa ist dieser Unterschied gegenüber Risø 16 statistisch gesichert. Die zweifaktorielle ANOVA ergab in diesem Fall, dass sich 'Bomi' und die Mutanten voneinander unterscheiden. Dieses Ergebnis ist jedoch unter Vorbehalt zu werten, da die Voraussetzung der Varianzhomogenität für diesen Test verletzt war (nicht dargestellt).

Der Wassergehalt der Endosperme sank von 8 zu 20 dpa bei allen Genotypen. Zum Zeitpunkt 8 dpa wurden, im Vergleich zu 14 und 20 dpa keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt (Abb. 28). Zu den beiden letzten Beprobungsterminen lagen die Wassergehalte bei Risø 16 im Vergleich zu 'Bomi' signifikant höher. Die Gehalte von Risø 13 unterschieden sich nicht von jenen der beiden anderen Genotypen, wobei jedoch zu beachten ist, dass die Streuung der Werte bei dieser Mutante zu 14 und 20 dpa im Vergleich mit allen anderen Varianten auffällig erhöht ist.

Der Vergleich der Versuchsjahre im Hinblick auf die Trockenmasse zu 20 dpa (Abb. 29) zeigt, dass 2010, ebenso wie für die vegetativen Organe des Haupttriebes (siehe 4.1.1), der Trend zu niedrigeren Werten bestand, welcher im

Fall von Risø 13 statistisch gesichert ist. Zwischen den Genotypen wurde 2010 abweichend zum Vorjahr kein signifikanter Unterschied festgestellt, jedoch war auch in diesem Jahr die Tendenz zu einer höheren Endospermtrieckmasse beim Wildtyp im Vergleich zu den Mutanten vorhanden.

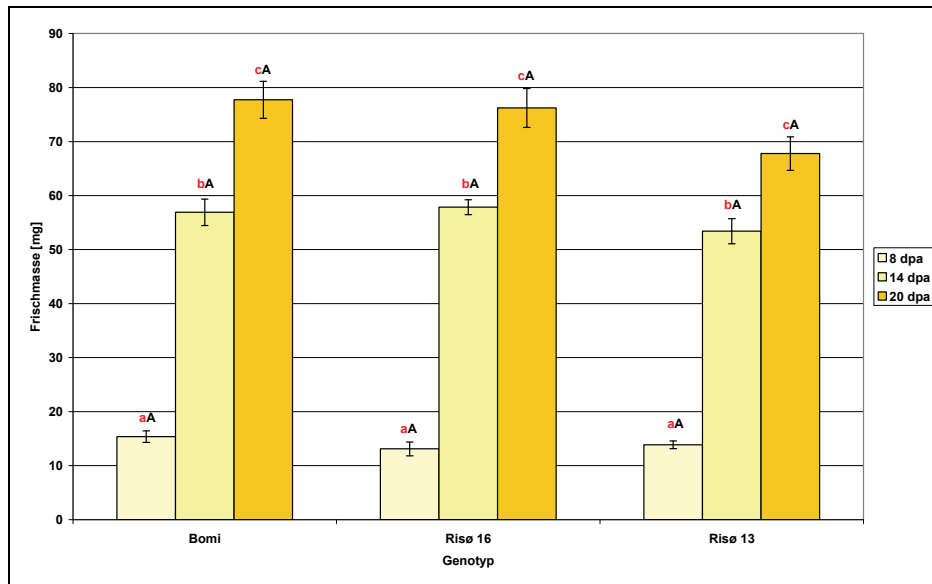


Abb. 26: Frischmasse [mg] pro Endosperm (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 8, 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch 2009. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Probenahmetermine eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für einen Probenahmetermin)

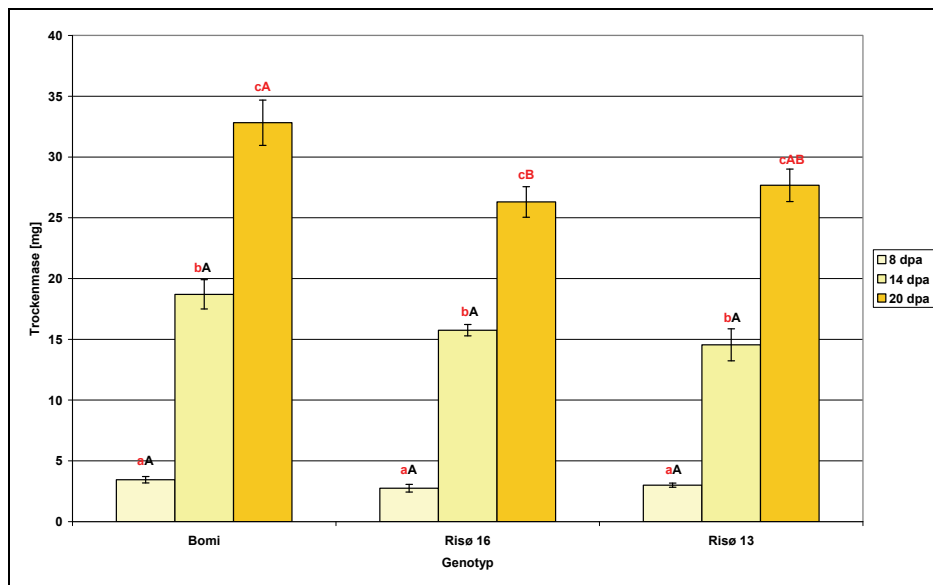


Abb. 27: Trockenmasse [mg] pro Endosperm (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 8, 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch 2009. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Probenahmetermine eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für einen Probenahmetermin)

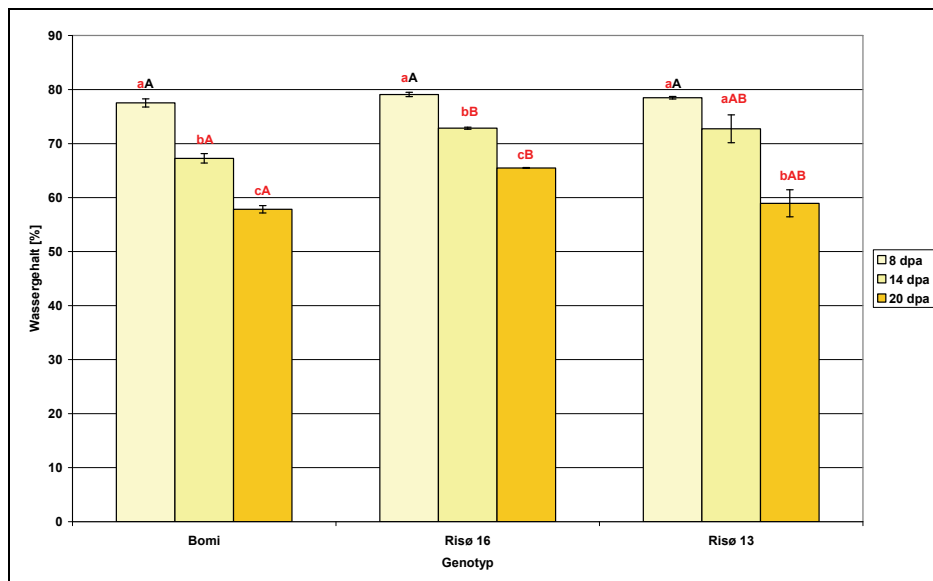


Abb. 28: Wassergehalt [%] pro Endosperm (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 8, 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch 2009. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Probenahmetermine eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für einen Probenahmetermin)

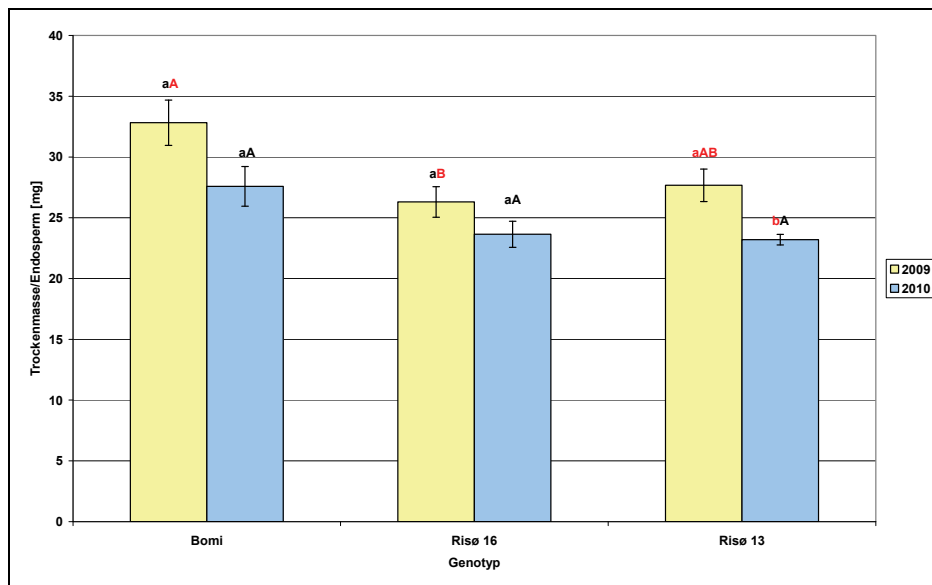


Abb. 29: Vergleich der mittleren Endospermtrockenmassen [mg] der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 20 dpa (Haupttrieb) aus den Versuchsjahren 2009 und 2010. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Versuchsjahre je Genotyp, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für ein Versuchsjahr)

4.1.5 Endosperm – ^{13}C -Anreicherung

Die Bestimmung der Gesamt-Kohlenstoffmengen im Endosperm war aufgrund der dafür notwendigen Einwaage und den geringen Probenmassen nicht durchführbar. Daher ist die Berechnung des ^{13}C -Überschusses [μg] nicht möglich und ^{13}C kann nur als ^{13}C -Anreicherung in Atom-% über dem Standard (Harnstoff) angegeben werden.

Wie aus Abb. 30 ersichtlich, zeigten der Wildtyp und die Mutanten 2009 ein ähnliches Muster hinsichtlich der ^{13}C -Anreicherung im Endosperm zu den drei Beprobungsterminen. In allen Fällen lagen die Mittelwerte zu 14 dpa am höchsten, während die Werte zu 8 dpa und 20 dpa etwa gleich hoch ausfielen. Diese beobachteten Unterschiede sind jedoch nicht in allen Fällen statistisch gesichert (siehe Abb. 30). Ein Einfluss des Prüffaktors Genotyp konnte zu keinem Probenahmetermin festgestellt werden, doch lag die ^{13}C -Anreicherung im Endosperm bei 'Bomi' zu 20 dpa im Mittel 0,027 Atom-% über jener der Mutanten. Im Vergleich dazu betrug der maximale Unterschied der mittleren ^{13}C -

Anreicherung in den vegetativen Organen zu 20 dpa zwischen den drei Genotypen maximal 0,003 Atom-%.

Im Wiederholungsversuch 2010 wurde im Vergleich zum ersten Hauptversuch bei allen Genotypen eine tendenziell geringere ^{13}C -Anreicherung im Endosperm bestimmt. Im Fall von 'Bomi' fiel dieser Unterschied mit einer Verringerung der Mittelwerte um 0,048 Atom-% sehr deutlich aus (Abb. 31).

Sowohl 2010, als auch 2009 wurde kein signifikanter Einfluss des Prüffaktors Genotyp festgestellt. Bei 'Bomi' bestand jedoch 2010 eine starke Tendenz zu einer, im Vergleich zu den Mutanten geringeren ^{13}C -Anreicherung, während im Vorjahr der entgegengesetzte Trend bestand.

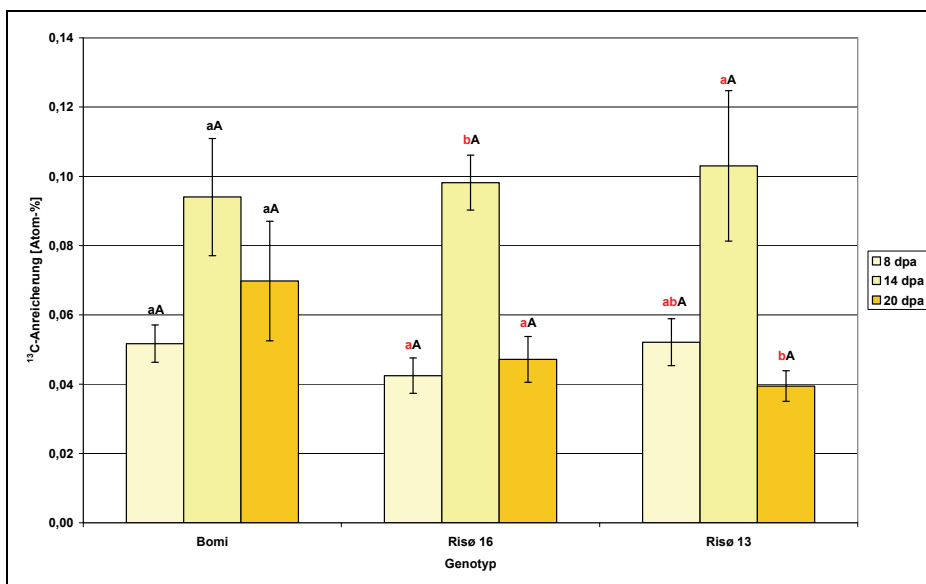


Abb. 30: ^{13}C -Anreicherung über dem Standard [Atom-%] pro Endosperm (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 8, 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch 2009. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Probenahmeterminen eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für einen Probenahmetermin)

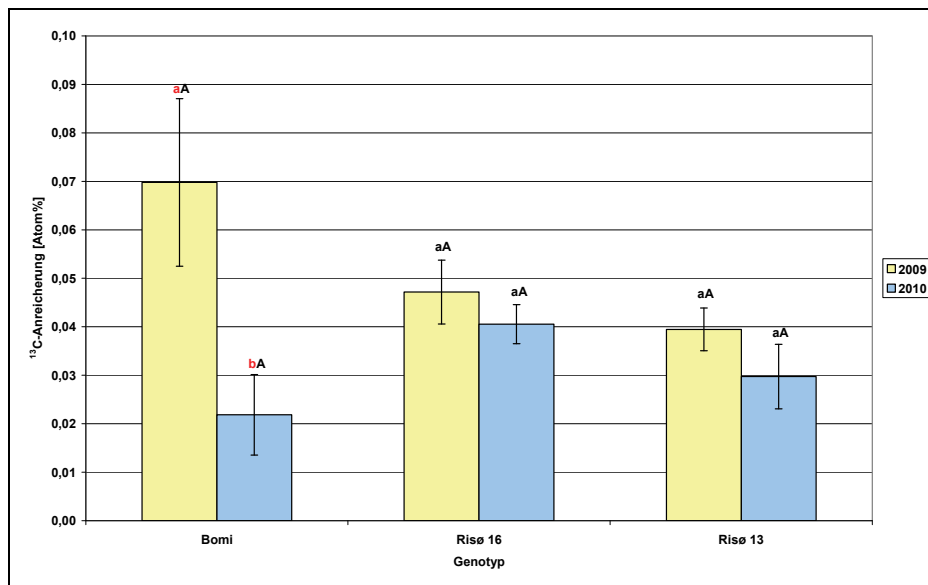


Abb. 31: Vergleich der mittleren ^{13}C -Anreicherung über dem Standard [Atom-%] pro Endosperm (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 20 dpa aus den Versuchsjahren 2009 und 2010. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Versuchsjahre je Genotyp, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für ein Versuchsjahr)

4.1.6 Endosperm – Gesamt-N und ^{15}N -Überschuss

Die Stickstoffmenge im Endosperm reflektiert zum größten Teil die Menge der akkumulierten Proteine, gibt aber keine Information über die Herkunft des Stickstoffs.

Im ersten Hauptversuch zeigte sich hinsichtlich der N-Menge pro Endosperm ein deutlicher Effekt des Beprobungstermins (Abb. 32). Es kam sowohl beim Wildtyp, als auch bei den Mutanten zu einem Anstieg von 8 dpa zu 14 dpa und weiterhin zu 20 dpa. Zum Zeitpunkt 8 dpa konnte kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden und die N-Menge pro Endosperm lag bei ca. 0,1 mg. Bis zur nächsten Beprobung zu 14 dpa stieg sie bei 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 um das 4,2-, 4,3- bzw. 3,4-fache. Auch zu 14 dpa bestand kein gesicherter Unterschied zwischen den Genotypen, jedoch lag die N-Menge bei 'Bomi' tendenziell am höchsten. Im Zeitraum von 14 zu 20 dpa verringerten sich die Zuwachsfaktoren der N-Menge auf 1,7, 1,5 sowie 1,9 für 'Bomi', Risø 16 bzw. Risø 13. Zu 20 dpa wurde zwischen Wildtyp und Mutan-

ten ein signifikanter Unterschied festgestellt, während sich letztere nicht voneinander unterschieden.

Der Prüffaktor Versuchsjahr hatte keinen Einfluss auf die N-Menge pro Endosperm zu 20 dpa (Tab. 8). Bei der Wiederholung des Versuches im Jahr 2010, wurde im Gegensatz zum Vorjahr kein deutlicher Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt, jedoch lag der Mittelwert tendenziell auch im zweiten Hauptversuch bei 'Bomi' am höchsten.

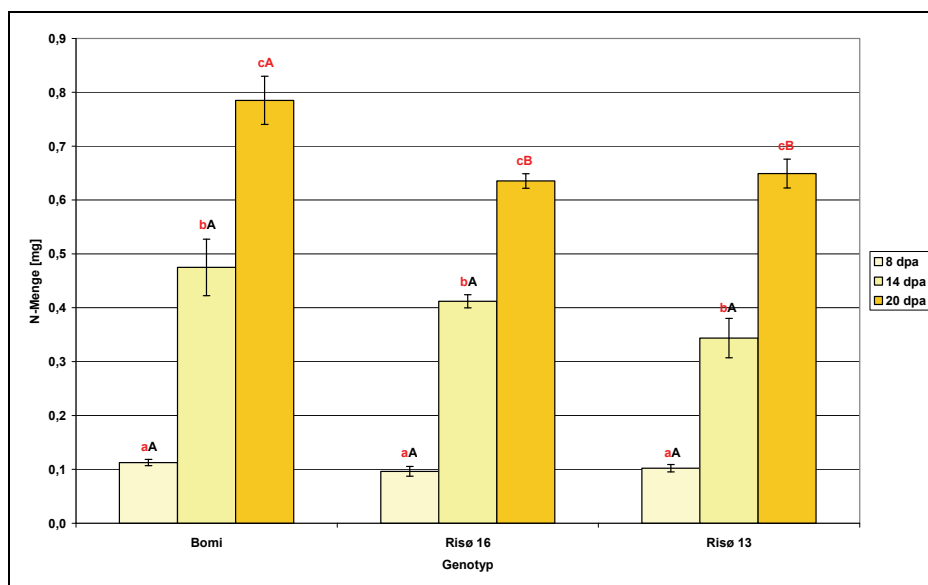


Abb. 32: N-Menge [mg] pro Endosperm (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 8, 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch 2009. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Probenahmeterminale eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für einen Probenahmetermin)

Tab. 8: Mittlere N-Menge [mg] und N-Massenanteil [% TM] (\pm SE) in den Endospermen des Haupttriebes 2009 und 2010 der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 20 dpa. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Versuchsjahre für einen Genotyp, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für ein Versuchsjahr)

Genotyp	N-Menge [mg]		N-Massenanteil [% TM]	
	2009	2010	2009	2010
'Bomi'	0,79 \pm 0,04 ^{aA}	0,71 \pm 0,03 ^{aA}	2,40 \pm 0,11 ^{aA}	2,60 \pm 0,12 ^{aA}
Risø 16	0,64 \pm 0,01 ^{aB}	0,67 \pm 0,04 ^{aA}	2,43 \pm 0,10 ^{aA}	2,85 \pm 0,19 ^{aA}
Risø 13	0,65 \pm 0,03 ^{aB}	0,59 \pm 0,03 ^{aA}	2,35 \pm 0,09 ^{aA}	2,55 \pm 0,13 ^{aA}

Der N-Massenanteil an der Trockenmasse in den Endospermen zeigte 2009 bei allen Genotypen eine ähnliche Kinetik (Abb. 33) und es wurde zu keinem Probenahmetermin ein Einfluss des Prüffaktors Genotyp festgestellt. Zum Zeitpunkt 8 dpa lag der Anteil zwischen 3,3 % TM ('Bomi') und 3,5 % TM (Risø 16). In den folgenden sechs Versuchstagen kam es zu einer deutlichen Absenkung auf 2,6 - 2,4 % TM (Risø 16 bzw. Risø 13). Im Abgleich mit den steigenden N-Mengen bedeutet dies, dass mehr Kohlenstoff im Endosperm eingelagert wurde. Bis zum Probenahmetermin 20 dpa blieb der N-Massenanteil konstant und betrug dann im Mittel aller Genotypen 2,4 % TM. Somit stieg die Stickstoff- und Kohlenstoffakkumulation zwischen 14 und 20 dpa in gleichem Maße an.

Die Ergebnisse aus 2009 konnten diesbezüglich bestätigt werden, da beim Vergleich der untersuchten Genotypen für 2010 wie auch bei der Gegenüberstellung der Versuchsjahre keine signifikanten Unterschiede feststellbar waren (Tab. 8).

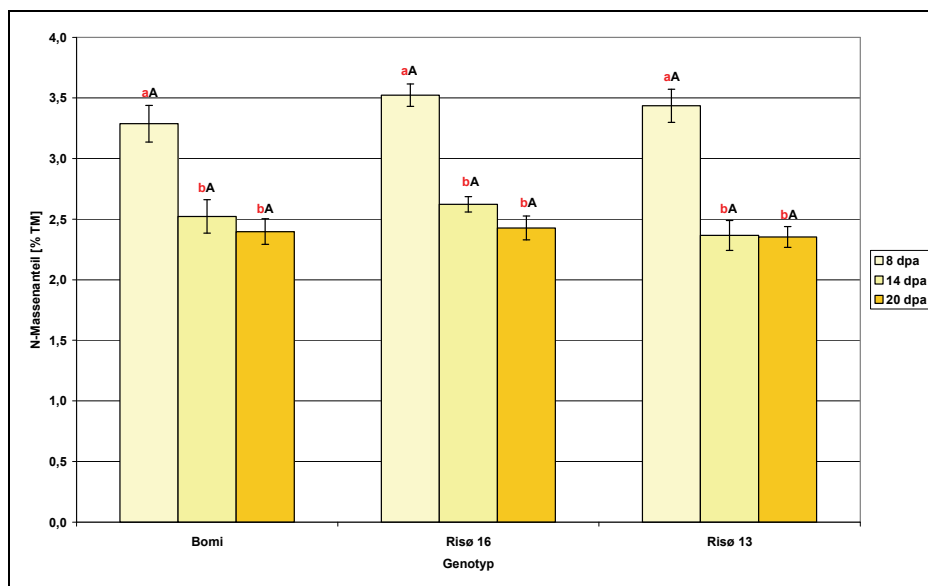


Abb. 33: N-Trockenmasseanteil [% TM] pro Endosperm (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 8, 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch 2009. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Probenahmeterminale eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für einen Probenahmetermin)

Der ^{15}N -Überschuss gibt Aufschluss über den Beitrag des Stickstoffs, welcher von der Pflanze im Zeitraum von vier Tagen vor Probenahme über die Wurzel aufgenommen und in das Endosperm verlagert wurde. Im ersten Hauptversuch war diesbezüglich nur zum Beprobungstermin 8 dpa ein Einfluss des Prüffaktors Genotyp zu verzeichnen. Zu diesem Zeitpunkt wurde bei 'Bomi' mit $3,8\text{ }\mu\text{g}$ pro Endosperm signifikant mehr ^{15}N inkorporiert als bei Risø 16 mit $2,7\text{ }\mu\text{g}$. Risø 13 unterschied sich hingegen mit $3,3\text{ }\mu\text{g}$ ^{15}N von keinem der zuvor genannten Genotypen. Beim Wildtyp und den Mutanten zeigte der zeitliche Verlauf der ^{15}N -Inkorporation im Endosperm eine hohe Übereinstimmung. Im Zeitraum von 8 bis 14 dpa kam es zu einer starken Zunahme des ^{15}N -Überschusses um das 3,2-, 3,8- und 3,5-fache bei 'Bomi', Risø 16 bzw. Risø 13, wobei der Unterschied bei erstgenanntem Genotyp zu 14 dpa nicht statistisch gesichert ist. Die Mittelwerte zu den Terminen 14 und 20 dpa unterschieden sich in keinem Fall deutlich. Bei allen Genotypen bestand ein statistisch gesicherter Unterschied zwischen 8 und 20 dpa. Risø 13 wies zu 20 dpa tendenziell den geringsten ^{15}N -Überschuss im Endosperm auf (Abb. 34).

Zwischen den Versuchsjahren sowie beim Vergleich der Genotypen 2010 bestehen keine Unterschiede für diesen Parameter zum Zeitpunkt 20 dpa, was die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der ^{15}N -Markierungsmethode belegt (Tab. 9).

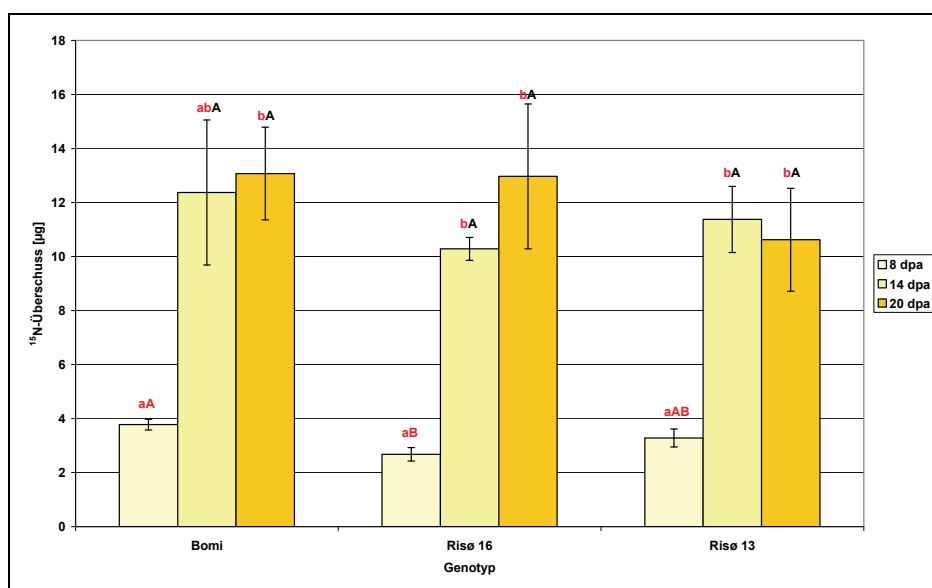


Abb. 34: ¹⁵N-Überschuss [µg] pro Endosperm (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 8, 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch 2009. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Probenahmetermine eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für einen Probenahmetermin)

Tab. 9: Mittlerer ¹⁵N-Überschuss [µg * Endosperm⁻¹] und ¹⁵N-Massenanteil [µg ¹⁵N * g⁻¹ TM] (± SE) in den Endospermen des Haupttriebes 2009 und 2010 der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 20 dpa. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Versuchsjahre für einen Genotyp, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für ein Versuchsjahr)

Genotyp	¹⁵ N-Überschuss [µg]		¹⁵ N-Massenanteil [µg ¹⁵ N * g ⁻¹ TM]	
	2009	2010	2009	2010
'Bomi'	13,07 ± 1,71 aA	12,38 ± 0,84 aA	393,71 ± 32,06 aA	463,34 ± 45,45 aA
Risø 16	12,97 ± 2,68 aA	11,29 ± 1,57 aA	504,51 ± 124,5 aA	481,80 ± 71,63 aA
Risø 13	10,62 ± 1,91 aA	11,08 ± 1,11 aA	386,31 ± 76,7 aA	477,65 ± 48,57 aA

Für den ¹⁵N-Massenanteil an der Trockenmasse der Endosperme im ersten Hauptversuch ergibt sich ein ähnliches Bild wie für den N-Massenanteil, jedoch zeigt sich für ¹⁵N eine stärkere Tendenz zu sinkenden Anteilen zwischen

14 und 20 dpa. Dies steht im Einklang mit den konstanten ^{15}N -Überschusswerten, bei steigenden Trockenmassen und N-Mengen in diesem Zeitintervall. Von 8 dpa zu 20 dpa wurde eine Verringerung des mittleren ^{15}N -Massenanteils um 65,6 %, 49,5 % sowie 64 % bei 'Bomi', Risø 16 bzw. Risø 13 beobachtet (Abb. 35). Zu den einzelnen Probenahmeterminen bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen.

Die Ergebnisse des ersten Hauptversuches wurden hinsichtlich dieses Parameters 2010 für den Probenahmetermin 20 dpa bestätigt (Tab. 9). Es bestand kein Einfluss des Prüffaktors Versuchsjahr und auch ein Effekt des Genotyps konnte in beiden Jahren nicht nachgewiesen werden. Tendenziell lag der mittlere ^{15}N -Massenanteil bei Risø 16 zu 20 dpa in beiden Versuchsjahren gegenüber den anderen Genotypen höher, 2009 jedoch in stärkerem Ausmaß.

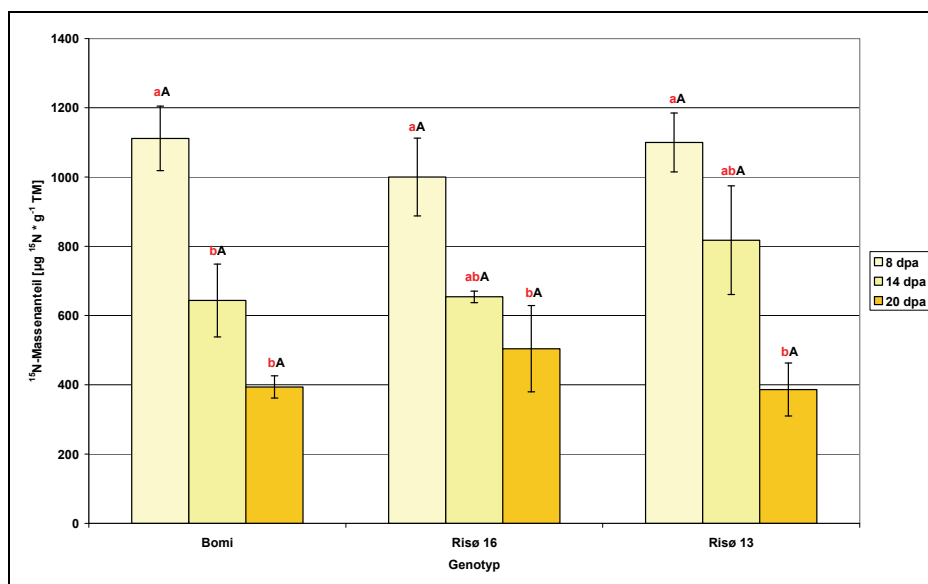


Abb. 35: ^{15}N -Trockenmasseanteil [$\mu\text{g } ^{15}\text{N} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TM}$] pro Endosperm (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 8, 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch 2009. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Probenahmetermine eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für einen Probenahmetermin)

4.1.7 Die Zusammensetzung des reifen Korns

In der Literatur finden sich für die Gehalte von Inhaltstoffen im Gerstenkorn vorwiegend Angaben für das Reifestadium. Um die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse besser in den Kontext anderer Studien stellen zu können, wurden daher die Massen und Rohnährstoffgehalte für die reifen Körner der drei Genotypen aus dem ersten Hauptversuch bestimmt (Tab. 10). Betrachtet man die Ausgangsmasse (luftgetrocknet), so fällt auf, dass diesbezüglich kein Unterschied zwischen 'Bomi' und Risø 16 zu verzeichnen war, während der Wert von Risø 13 deutlich niedriger lag. Hinsichtlich der Rohnährstoffgehalte hebt sich hingegen 'Bomi' deutlich von den Mutanten ab, welche ihrerseits nur geringfügig voneinander abweichen. Pro Korn finden sich bei 'Bomi' 1,7 %, 2,2 % und 1,1 % weniger Rohprotein (RP), Rohfett (RF) bzw. Rohfaser (RFA) gegenüber dem Mittel der Mutanten, jedoch 5,1 % mehr NfE. Letztere bestehen aus Stärke, löslichen Zuckern und löslichen Teilen der Zellulose, Lignine und Pektine [79]. Der Rohaschegehalt (RA; Mineralstoffe) ist mit Werten nahe 3,0 % bei allen drei Genotypen sehr ähnlich. Berechnet man für die Mutanten die Mengen [mg] der einzelnen Rohnährstoffe pro Korn und setzt diese ins Verhältnis zum Wildtyp, so findet man bei Risø 16 104 % RA, 110 % RP, 207 % RF, 125 % RFA sowie 93 % NfE. Für Risø 13 ergeben sich entsprechend 68 % RA, 80 % RP, 125 % RF, 86 % RFA und 60 % NfE.

Tab. 10: Rohnährstoffgehalte im reifen Korn (2009) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13. (EKG – Einzelkorngewicht* = Bezugsgröße, RA - Rohasche, RP - Rohprotein, RF - Rohfett, RFA - Rohfaser, NfE - stickstofffreie Extraktstoffe; *Masse vor Trocknung bei 105 °C)

Genotyp	EKG [mg]	RA [%]	RP [%]	RF [%]	RFA [%]	NfE [%]
'Bomi'	59	2,87	16,37	2,16	3,86	74,74
Risø 16	59	2,99	18,03	4,48	4,83	69,67
Risø 13	38	3,04	18,04	4,18	5,17	69,57

4.1.8 Proteinfraktionen des Endosperms – Gesamt-N und ^{15}N -Überschuss

Zur vertiefenden Untersuchung der Stickstoffverteilung im Endosperm erfolgte die Extraktion der Proteinfraktionen Albumine/Globuline (AG), Hordeine (HOR) sowie Gluteline (GLU) aus den Proben der Termine 14 und 20 dpa. Es wurde nicht deren Trockenmasse, sondern der enthaltene Stickstoff als Maß für den Proteingehalt ausgewertet.

Die Stickstoffmengen in den Proteinfraktionen aus dem Versuchsjahr 2009 offenbaren, besonders zu 20 dpa, Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten (Abb. 36). Zum Probenahmetermin 14 Tage nach Anthese zeigten sich vor allem in der AG-Fraktion Abweichungen zwischen den Genotypen. Die mittlere N-Menge (N_{AG}) pro Endosperm lag mit 80,4 μg bei Risø 16 deutlich über jener von Risø 13 (44,8 μg) und 'Bomi' (22,8 μg). Hinsichtlich der HOR-Fraktion bestand zu 14 dpa nur eine leichte Tendenz zu einer erhöhten N-Menge (N_{HOR}) bei 'Bomi'. Die mittleren N-Mengen in der GLU-Fraktion (N_{GLU}) bewegen sich zu diesem Zeitpunkt bei allen drei Genotypen in einem sehr engen Bereich (88,2 - 89,7 μg).

Zwanzig Tage nach Anthese waren 2009 bezüglich der N_{AG} -Menge keine Unterschiede zwischen den Genotypen feststellbar. Hinsichtlich der N_{HOR} - und N_{GLU} -Menge unterschied sich 'Bomi' deutlich von den beiden Mutanten, welche wiederum ein gleiches Verteilungsmuster aufwiesen. Die Stickstoffeinlagerung in die HOR-Fraktion war zu 20 dpa mit 328,7 μg bei 'Bomi' deutlich höher als bei Risø 16 (200 μg) und Risø 13 (210,9 μg). Zu beachten ist jedoch, dass der Zuwachsfaktor in dieser Fraktion, in den davor liegenden sechs Tagen bei Risø 16 ($\times 3,9$) und Risø 13 ($\times 3,6$) höher ausfiel als beim Wildtyp ($\times 2,6$). Für die N_{GLU} -Menge zeigte sich im Vergleich zu den Hordeinen ein entgegengesetztes Bild zu 20 dpa. Der Wert von 'Bomi' lag in diesem Fall mit 112,9 μg deutlich unter jenen von Risø 16 (155 μg) und Risø 13 (145,2 μg).

Die Gegenüberstellung der Versuchsjahre 2009 und 2010 (20 dpa) offenbart Unterschiede hinsichtlich der N-Mengen in den Fraktionen (Abb. 37). So wurde 2010 bei Risø 13 deutlich mehr Stickstoff in der AG-Fraktion eingelagert. Dies war tendenziell ebenso bei Risø 16 zu beobachten. Während 2009 alle

Genotypen die gleichen N_{AG} -Mengen zu 20 dpa aufwiesen, lagen die Mittelwerte der Mutanten 2010 signifikant höher als die Werte von 'Bomi'.

Die Betrachtung der Hordeinfraktion zeigt, dass die Stickstoffeinlagerung bei 'Bomi' 2010 wie bereits 2009 am höchsten ausfiel, jedoch im Vergleich zum Vorjahr signifikant erniedrigt war. Für Risø 16 wurden diesbezüglich keine Unterschiede zwischen den Versuchsjahren festgestellt. Die N_{HOR} -Menge bei Risø 13 fiel 2010 drastisch niedriger aus und lag deutlich unter jenen der anderen beiden Genotypen. In diesem Fall ist 2010 nach Abgleich mit den N-Mengen im Gesamtendosperm (Tab. 8) ein Extraktionsfehler zu vermuten.

Hinsichtlich der Gluteline kam es bei Risø 16 zu einer signifikanten Verringerung der N_{GLU} -Menge und auch bei 'Bomi' war eine Tendenz zu niedrigeren Werten 2010 zu verzeichnen. Risø 13 zeigte diesbezüglich keine Unterschiede. Beim Vergleich der Genotypen ergab sich in beiden Versuchsjahren ein ähnliches Bild, jedoch war für Risø 16 2010 nur eine Tendenz zu einer höheren N_{GLU} -Menge gegenüber 'Bomi' zu erkennen, während sich die Mittelwerte 2009 deutlich unterschieden.

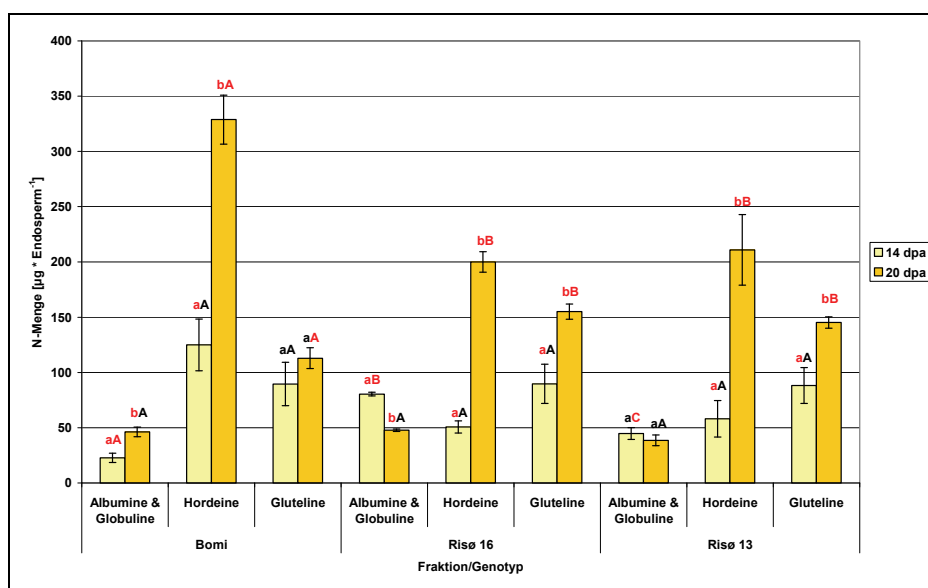


Abb. 36: N-Menge [$\mu\text{g} \cdot \text{Endosperm}^{-1}$] der Proteinfractionen pro Endosperm (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch 2009. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Probenahmeterminen für eine Fraktion eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für eine Fraktion zu einem Probenahmetermin)

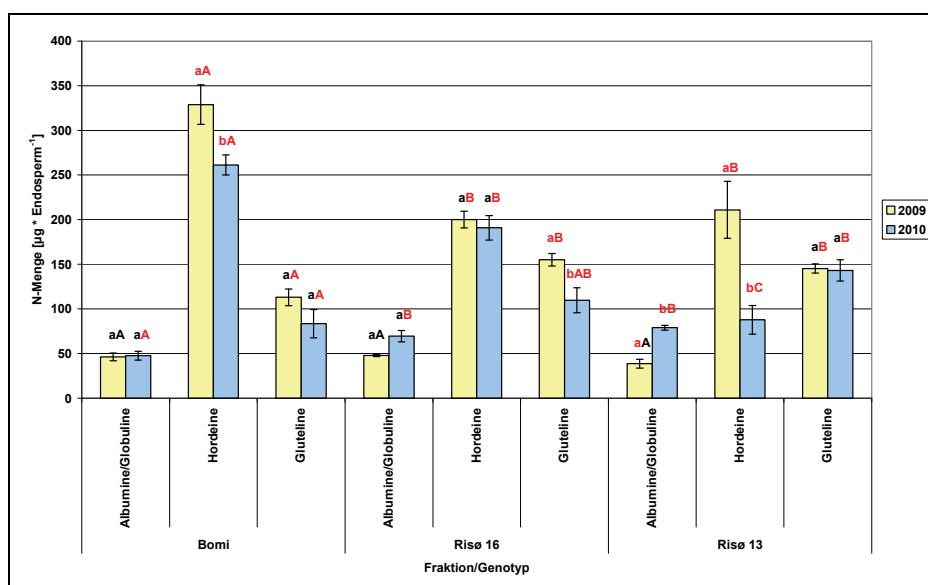


Abb. 37: Vergleich der Versuchsjahre 2009 und 2010 hinsichtlich der N-Menge [$\mu\text{g} \cdot \text{Endosperm}^{-1}$] der Proteinfractionen pro Endosperm (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 20 dpa. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Versuchsjahre für eine Fraktion eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für eine Fraktion eines Versuchsjahres)

Für die Massenanteile des Stickstoffs in den Proteinfractionen an der Trockenmasse des Endosperms ergab sich 2009 ein ähnliches Bild wie für die N-Mengen (Abb. 38).

Zu 14 dpa zeigten sich bei der AG-Fraktion noch Unterschiede zwischen den Genotypen. Risø 16 erreichte mit 0,5 % TM den höchsten Wert, gefolgt von Risø 13 (0,3 % TM) und 'Bomi' (0,1 % TM). Zum nächsten Probenahmetermin (20 dpa) konnten hingegen keine signifikanten Abweichungen zwischen den Genotypen festgestellt werden.

Der Beitrag der HOR-Fraktion zur Trockenmasse des Endosperms lag bei 'Bomi' zu 14 dpa tendenziell höher als bei den Mutanten, welche sich ihrerseits nicht unterschieden. In den folgenden sechs Tagen stieg der Anteil der Hordeine an der Trockenmasse sowohl bei Wildtyp, als auch Mutanten und der zuvor beobachtete Unterschied ist zu 20 dpa statistisch gesichert.

Für die GLU-Fraktion zeigten sich zu 14 dpa keine gesicherten Unterschiede zwischen den Genotypen. Zu 20 dpa fiel der N_{GLU} -Massenanteil bei 'Bomi' gegenüber den Mutanten deutlich niedriger aus. Risø 16 und Risø 13 unterschieden sich auch zu diesem Probenahmetermin nicht.

Der Vergleich der Versuchsjahre 2009 und 2010 bezüglich der Beiträge der einzelnen Fraktionen zur Trockenmasse des Endosperms zu 20 dpa zeigt, dass nur bei den Mutanten Unterschiede bestanden (Abb. 39). Der N_{AG} -Massenanteil stieg im Wiederholungsversuch sowohl bei Risø 16, als auch Risø 13 und jener der HOR-Fraktion fiel bei Risø 13 drastisch ab. Der Einfluss der Prüffaktors Genotyp war in den Versuchsjahren nicht identisch. 2010 lag der N_{AG} -Massenanteil beim Wildtyp unter jenem der Mutanten, während im Vorjahr kein Unterschied festgestellt wurde. Für die HOR-Fraktion von 'Bomi' und Risø 16 ergab sich in beiden Versuchen ein sehr ähnliches Bild, jedoch war die beobachtete Differenz 2010 statistisch nicht gesichert. Risø 13 unterschied sich im Wiederholungsversuch durch die bereits erwähnte Verringerung des N_{HOR} -Massenanteils klar von den beiden anderen Genotypen. Der N_{GLU} -Massenanteil war bei allen Genotypen in beiden Jahren sehr ähnlich, jedoch fiel der Unterschied zwischen 'Bomi' und Risø 16 2010 im Gegensatz zum Vorjahr nicht signifikant aus, sondern bestand nur als starke Tendenz.

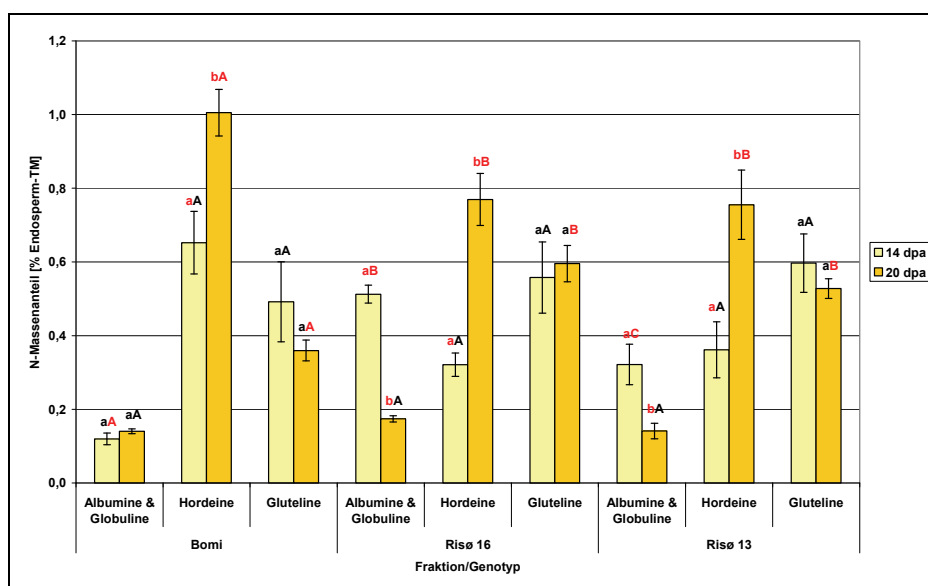


Abb. 38: Anteile des N in den Proteinfractionen an der Endosperm-TM (Haupttrieb) für die Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch (2009). (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Probenahmeterminen für eine Fraktion eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für eine Fraktion zu einem Probenahmetermin)

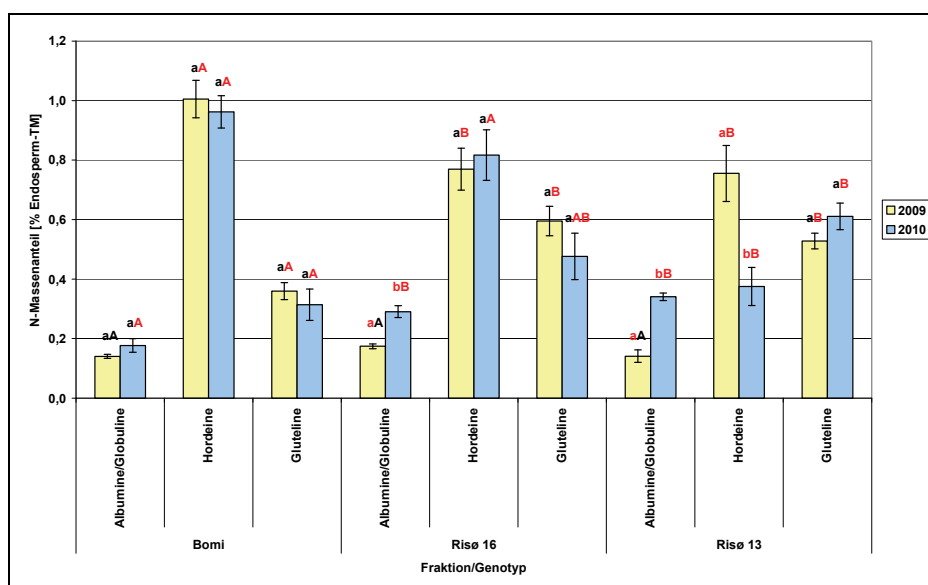


Abb. 39: Vergleich der Versuchsjahre 2009 und 2010 hinsichtlich der Anteile des N in den Proteinfractionen an der Endosperm-TM (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 20 dpa. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Versuchsjahre für eine Fraktion eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für eine Fraktion eines Versuchsjahres)

Um die Dynamik der Bildung der drei Proteinfractionen in Relation zur Gesamt-Proteinsynthese im Endosperm besser verfolgen zu können, wurden die prozentualen Anteile der N-Mengen in den einzelnen Fraktionen am insgesamt extrahierten Stickstoff berechnet. Die Werte für den ersten Hauptversuch sind in Abb. 40 dargestellt. Zum Zeitpunkt 14 dpa setzte sich das extrahierte Protein bei 'Bomi' aus 9,7 % AG, 51,9 % HOR und 39 % GLU zusammen. Zur sechs Tage späteren Beprobung bestand die Tendenz zu einem höheren Anteil der HOR-Fraktion (67,1 %) und einem geringeren im Fall der Gluteline (23,9 %), jedoch waren diese Unterschiede signifikant.

Risø 16 unterschied sich zu 14 dpa vom Wildtyp durch einen weitaus höheren Anteil der AG-Fraktion (37,7 %) sowie einen geringeren Beitrag der Hordeine (22,3 %) während die Gluteline mit 40 % nicht abwichen. Zwanzig Tage nach Anthese setzte sich das extrahierte Gesamtprotein dieser Mutante aus relativ weniger Albuminen und Globulinen (12,3 %), mehr Hordeinen (49,2 %) und einem unveränderten Anteil an Glutelinen (38,5 %) zusammen. Damit bestand 20 dpa im Fall der Hordeine und Gluteline ein klarer Unterschied zu 'Bomi'.

Die Zusammensetzung des Gesamtproteins von Risø 13 stimmte in der Tendenz mit jener von Risø 16 überein. Zu 14 dpa bestanden jedoch mit 23,2 % AG, 28,4 % HOR und 48,3 % GLU keine gesicherten Unterschiede zu den anderen Genotypen. In den folgenden sechs Tagen sank der Beitrag der Albumine und Globuline (10,2 %) sowie der Gluteline (37,4 %), während die HOR-Fraktion (52,5 %) dominanter wurde. Damit hob sich Risø 13 auch zu 20 dpa, mit Ausnahme eines deutlich höheren Anteils der Gluteline gegenüber 'Bomi', nicht von den anderen beiden Genotypen ab.

Insgesamt bestanden die stärksten Unterschiede zwischen den Genotypen 'Bomi' und Risø 16, während zwischen den Mutanten keine Unterschiede nachgewiesen wurden. Risø 13 zeigte zu 20 dpa hinsichtlich der Zusammensetzung der Proteinfractionen tendenziell stärkere Abweichungen zum Wildtyp während die Differenz der Mittelwerte zu Risø 16 mit Ausnahme der Albumine und Globuline geringer ausfiel.

Die Gegenüberstellung der Versuchsjahre 2009 und 2010 für den Termin 20 dpa (Abb. 41) zeigt, dass sich die Anteile der Proteinfractionen an der Summe des extrahierten Gesamtproteins im Fall von 'Bomi' nicht änderten. Bei Risø 16 war die AG-Fraktion 2010 tendenziell stärker ausgebildet, während der relative Beitrag der GLU-Fraktion deutlich abnahm. Die stärksten Abweichungen wurden für die Mutante Risø 13 beobachtet. Dies ist, wie bereits zuvor erwähnt, wahrscheinlich durch einen Extraktionsfehler bei den Hordeinen im Wiederholungsversuch bedingt. Der Vergleich der Genotypen 'Bomi' und Risø 16 ergibt in beiden Versuchsjahren das gleiche Bild. Bei Risø 16 fiel der Anteil der AG und GLU tendenziell höher, jener der HOR deutlich niedriger aus.

Im Zusammenhang mit den Anteilen der Fraktionen an der Summe des extrahierten proteinogenen Stickstoffs ist der Vergleich dieser Summen von Bedeutung (Tab. 11). Es konnten diesbezüglich weder für den Vergleich der Genotypen zu einem Probenahmetermin eines Versuchsjahres, noch der Versuchsjahre zu 20 dpa signifikante Unterschiede festgestellt werden. Tendenziell lag die Summe der extrahierten N-Mengen bei 'Bomi' jedoch für alle Varianten am höchsten. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass 'Bomi' bei gleicher *Sink*-Stärke in stärkerem Maße Trockenmasse im Endosperm einzulagern vermochte. Ferner wiesen die Mittelwerte der Mutanten 2009 eine geringere Differenz gegenüber 2010 auf und es bestand bei allen Genotypen der Trend zu niedrigeren Summen im letzten Versuchsjahr.

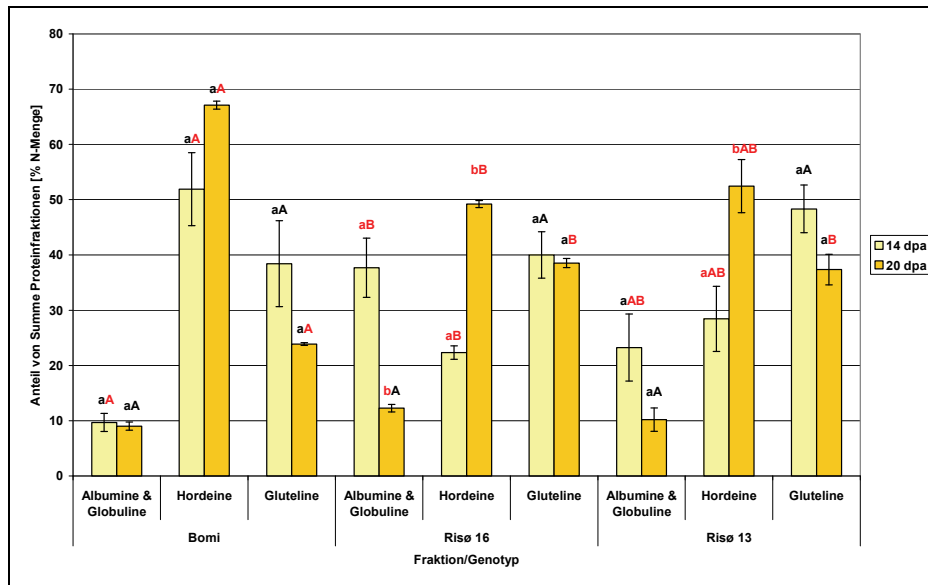


Abb. 40: Prozentualer Anteil der Proteinfraktion an der Summe des extrahierten N aller drei Proteinfraktionen des Endosperms (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch 2009. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Probenahmeterminen für eine Fraktion eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für eine Fraktion zu einem Probenahmetermin)

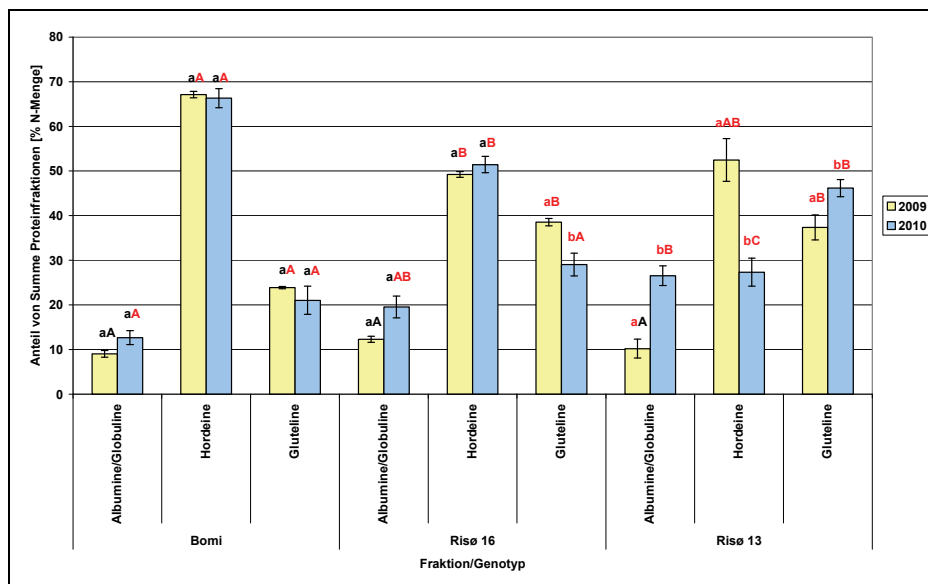


Abb. 41: Vergleich der prozentualen Anteile der Proteinfraktion an der Summe des extrahierten N aller drei Proteinfraktionen aus den Versuchsjahren 2009 und 2010 für den Zeitpunkt 20 dpa. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Versuchsjahre für eine Fraktion eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für eine Fraktion eines Versuchsjahres)

Tab. 11: Gesamt-extrahierter proteinogener Stickstoff pro Endosperm für die Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 in den Versuchsjahren 2009 (14 und 20 dpa) und 2010 (20 dpa). (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben – Vergleich der Genotypen für einen Probenahmetermin eines Versuchsjahres, Großbuchstaben – Vergleich der Versuchsjahre für einen Genotyp zu 20 dpa)

Genotyp	N pro Endosperm extrahiert [µg]		
	2009 - 14 dpa	2009 - 20 dpa	2010 - 20 dpa
'Bomi'	237,2 ± 27,2 ^a	459,7 ± 28,5 ^{aA}	387,8 ± 21,7 ^{aA}
Risø 16	198,4 ± 53,6 ^a	390,8 ± 8,8 ^{aA}	371,6 ± 24,3 ^{aA}
Risø 13	176,5 ± 58,0 ^a	394,7 ± 29,8 ^{aA}	313,0 ± 30,5 ^{aA}

Zur Klärung der Frage, in welchem Ausmaß die Inkorporation des vier Tage vor Probenahme über die Wurzel aufgenommenen Stickstoffs in die verschiedenen Proteinfractionen erfolgte, wurde für diese der ¹⁵N-Überschuss bestimmt.

Für die AG-Fraktion bestand im ersten Hauptversuch die Tendenz, dass bei 'Bomi' im Zeitraum von 10 bis 14 dpa gegenüber den Mutanten weniger ¹⁵N inkorporiert wurde (p-Wert ANOVA: 0,058), nicht jedoch, wie auch schon beim Gesamt-N, zwischen 16 und 20 dpa (Abb. 42). Weiterhin existierte, besonders zu 14 dpa, aber auch 20 dpa der Trend zu einem höheren ¹⁵N-Überschuss in der HOR-Fraktion beim Wildtyp. Auch der Fluss von ¹⁵N in die GLU-Fraktion zwischen 16 bis 20 dpa folgte dem Gesamt-N, wobei der Mittelwert bei 'Bomi' im Vergleich mit beiden Mutanten tendenziell niedriger lag. Die Unterschiede zwischen den Genotypen hinsichtlich des ¹⁵N in den Proteinfractionen waren in keinem Fall signifikant.

Bei allen Genotypen bestand von 14 dpa zu 20 dpa ein Trend zu steigenden ¹⁵N-Überschusswerten in der Hordeinfraction. In der AG-Fraktion beider Mutanten sowie in der GLU-Fraktion von 'Bomi' und Risø 13 fand sich zu 20 dpa tendenziell weniger ¹⁵N gegenüber 14 dpa. Die beobachteten Unterschiede sind nur für die AG- und HOR-Fraktion von Risø 16 statistisch gesichert.

Die Ergebnisse des ersten Hauptversuches hinsichtlich des ¹⁵N in den Proteinfractionen zu 20 dpa konnten in nahezu allen Fällen im Wiederholungsversuch 2010 bestätigt werden (Abb. 43). Nur für die AG-Fraktion von Risø 13 wurde

eine signifikante Abweichung festgestellt. Der Überschuss fiel dabei 2010 höher aus, was als Tendenz auch bei Risø 16, nicht aber bei 'Bomi' zu beobachten war. Bei dieser Betrachtung sind die Werte für den Gesamt-N (Abb. 37) zu beachten, die einen deutlichen Unterschied zwischen 'Bomi' und Risø 16 zu 20 dpa (2010) für die AG-Fraktion zeigten. Bezüglich des ^{15}N in den Hordeinen bestand 2010 wie bereits 2009 (20 dpa) der Trend zu dem höchsten Mittelwert bei 'Bomi', gefolgt von Risø 16 und dem niedrigsten bei Risø 13. Tendenziell lagen die Werte für die Hordeine 2010 bei allen drei Genotypen niedriger. Dies trifft besonders im Fall von Risø 13 zu, was den Verdacht eines Extraktionsfehlers bei den Hordeinen im Wiederholungsversuch erhärtet. In die GLU-Fraktion wurde 2010 von 16 - 20 dpa bei Risø 13 gegenüber 'Bomi' deutlich mehr ^{15}N eingelagert, während sich die Werte von Risø 16 weder von jenen des Wildtyps noch der anderen Mutante unterschieden. Im ersten Hauptversuch konnte dieser Sachverhalt aufgrund von Probenausfall bei 'Bomi' nicht untersucht werden.

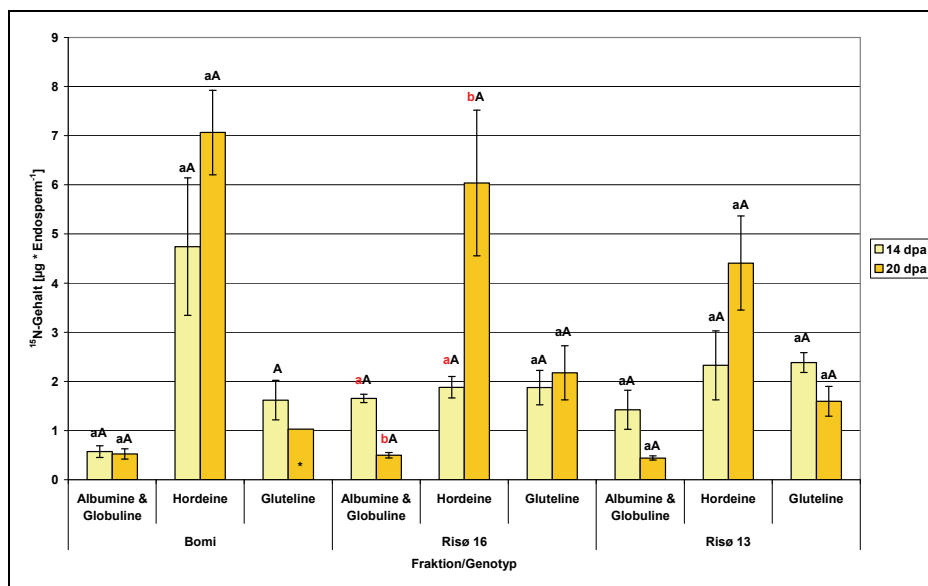


Abb. 42: ^{15}N -Überschuss [$\mu\text{g} \cdot \text{Endosperm}^{-1}$] der Proteinfractionen des Endosperms (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch 2009. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Probenahmeterminen für eine Fraktion eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für eine Fraktion zu einem Probenahmetermin; * $n < 3$)

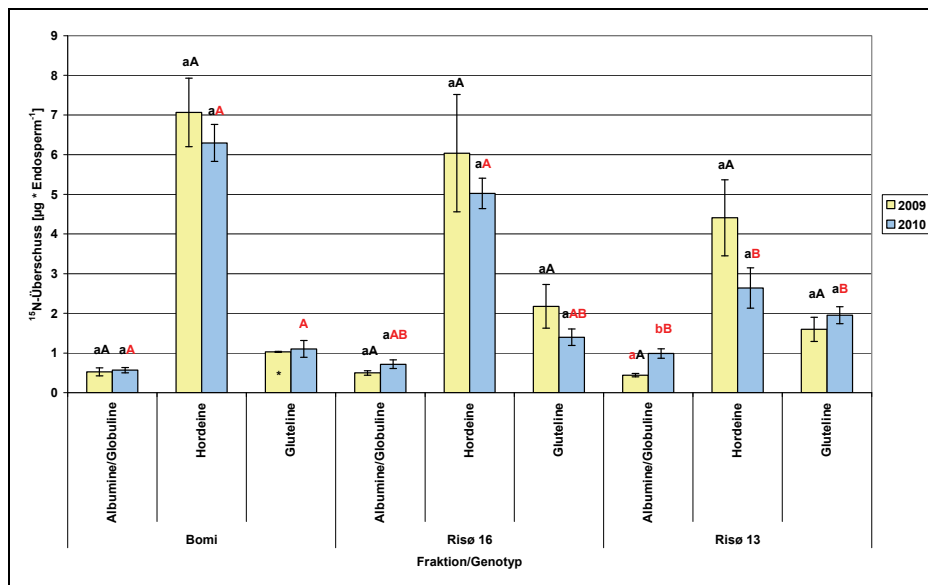


Abb. 43: Vergleich der Versuchsjahre 2009 und 2010 hinsichtlich des ^{15}N -Überschusses [$\mu\text{g} \cdot \text{Endosperm}^{-1}$] der Proteinfraktionen des Endosperms (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 20 dpa. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Versuchsjahre für eine Fraktion eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für eine Fraktion eines Versuchsjahres; * $n < 3$)

Die Massenanteile des ^{15}N in den Proteinfraktionen an der Endospermtrockenmasse aus dem ersten Hauptversuch sind in Abb. 44 dargestellt. Betrachtet man den Einfluss des Probenahmetermins, so bestand mit Ausnahme der Hordeine eine starke Tendenz zu abnehmenden ^{15}N -Anteilen von 14 dpa zu 20 dpa. Die Abweichung der Mittelwerte für die Albumine/Globuline von 'Bomi' und Risø 16 sowie für die Gluteline von Risø 13 ist signifikant. Für die Hordeine war keine Änderung, bzw. im Fall von Risø 16 ein tendenziell entgegengesetzter Effekt zu verzeichnen.

Beim Vergleich der Genotypen 2009 war durch die hohe Streuung der Werte zu keinem Zeitpunkt, für keine Fraktion ein gesicherter Unterschied feststellbar. Für die Albumine/Globuline bestand bei den Mutanten 14 dpa der Trend zu einem höheren ^{15}N -Beitrag zur Trockenmasse des Endosperms gegenüber dem Wildtyp, welcher zu 20 dpa nicht mehr existierte. Weiterhin fiel zu 14 dpa bei den Mutanten gegenüber 'Bomi' der Anteil der Hordeine tendenziell niedriger und jener der Gluteline höher aus.

Die Gegenüberstellung der Versuchsjahre (20 dpa) hinsichtlich dieses Parameters (Abb. 45) zeigt, dass mit Ausnahme der AG-Fraktion von Risø 13 (Anstieg) keine deutlichen Abweichungen auftraten. Zwischen den Genotypen waren 2010 mehr Unterschiede als im Vorjahr erkennbar. Der Trockenmassenanteil des ^{15}N der Fraktionen AG und GLU lag bei Risø 13 deutlich über- und im Fall der Hordeine unter jenem des Wildtyps. Das gleiche Bild ergibt sich beim Vergleich von Risø 13 mit Risø 16, mit Ausnahme der AG-Fraktion, für welche diesbezüglich kein deutlicher Unterschied erkennbar ist. Der Wildtyp und Risø 16 zeigten 2010 wie auch im Vorjahr keine Abweichungen.

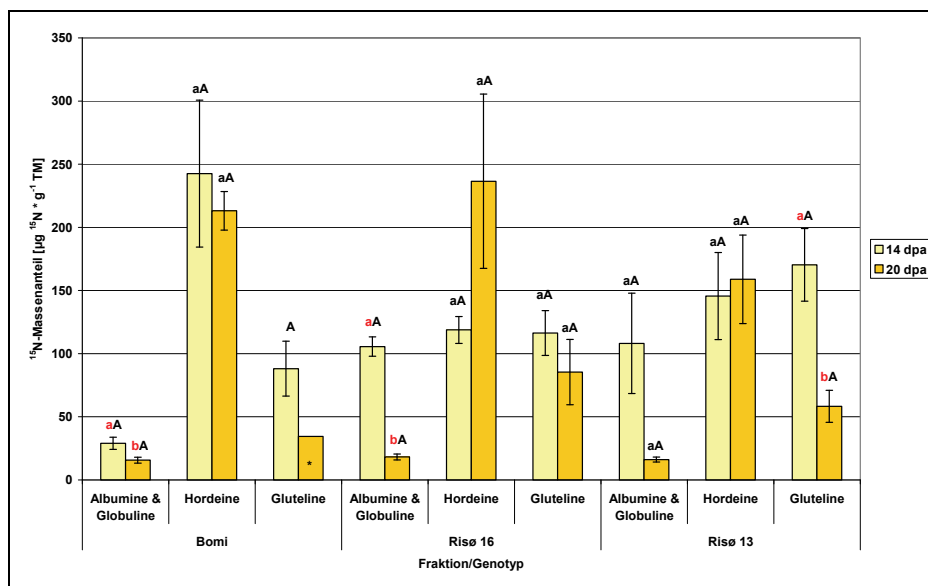


Abb. 44: Massenanteile des ^{15}N in den Proteinfractionen an der Trockenmasse des Endosperms [$\mu\text{g } ^{15}\text{N} \cdot \text{g}^{-1} \text{TM}$] (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch 2009. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Probenahmeterminen für eine Fraktion eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für eine Fraktion zu einem Probenahmetermin; * $n < 3$)

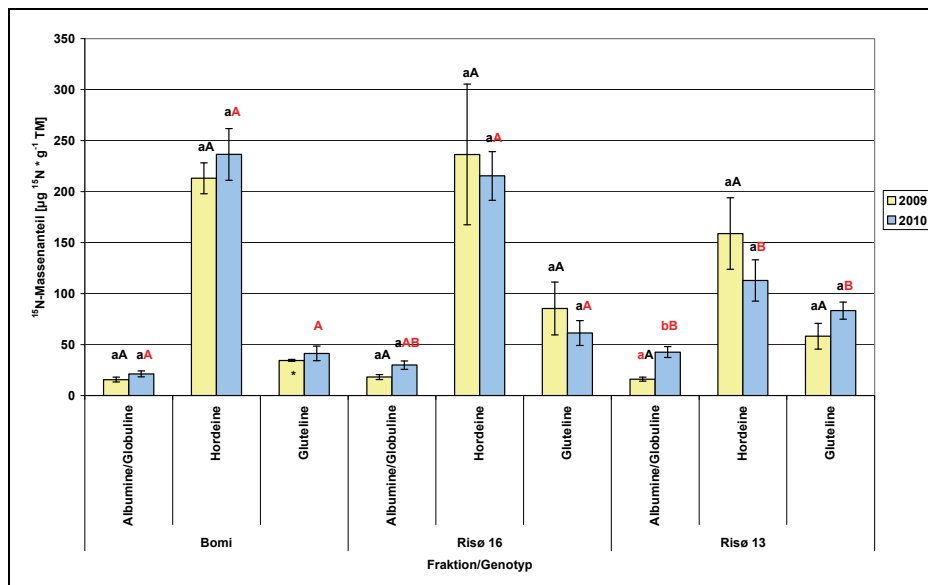


Abb. 45: Vergleich der Versuchsjahre 2009 und 2010 hinsichtlich der Massenanteile des ¹⁵N in den Proteinfractionen an der Trockenmasse des Endosperms [$\mu\text{g } ^{15}\text{N} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TM}$] (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 20 dpa. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Versuchsjahre für eine Fraktion eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für eine Fraktion eines Versuchsjahres; *n < 3)

Für die Anteile der Proteinfractionen an der Summe des ¹⁵N aller drei Proteinfractionen des Endosperms (Abb. 46) zeigte sich 2009 hinsichtlich des Einflusses des Probenahmetermins ein ähnliches Bild wie für die Anteile am extrahierten Gesamt-N. Die Fraktionen von 'Bomi' zu 20 dpa sind nur bedingt auswertbar, da durch Probenausfälle der Stichprobenumfang kleiner drei war. Die vorhandenen Daten von 'Bomi' deuten jedoch auf geringe Unterschiede hin. Eine leichte Abnahme in den Fraktionen AG und GLU und ein wachsender Anteil der Hordeine von 14 zu 20 dpa sind zu vermuten. Dieser Trend bestand in gleicher Weise bei den Mutanten und ist für die HOR-Fraktion gesichert (Risø 16: + 33 %, Risø 13: + 27 %). Der sinkende AG-Anteil war nur bei Risø 16 signifikant (- 23 %) doch die Tendenz auch bei Risø 13 vorhanden (- 12 %). Die Gluteline letztgenannten Genotyps trugen zu 20 gegenüber 14 dpa ebenfalls weniger zur insgesamt extrahierten ¹⁵N-Menge (µg) bei (- 15 %). Dies war tendenziell auch bei Risø 16 der Fall (- 10 %).

Gesicherte Unterschiede zwischen den Genotypen bestanden 2009, soweit berechenbar, nur zwischen 'Bomi' und Risø 16 zu 14 dpa hinsichtlich der AG- und HOR-Fraktion. Die zweifaktorielle Varianzanalyse (Genotyp x Probenah-

metermin) zeigt, dass bezüglich der AG-Fraktion über beide Termine ein Einfluss des Genotyps, mit einer klaren Abweichung zwischen 'Bomi' und Risø 16 vorhanden war. Dieses Ergebnis ist jedoch aufgrund eines signifikanten Interaktionseffektes beider Faktoren nicht interpretierbar. Für die Hordeine ergibt sich diesbezüglich ein deutlicher Unterschied zwischen Wildtyp und Mutanten. Die Gluteline unterscheiden sich hingegen bei Zusammenfassung der Probenahmetermine nicht (nicht dargestellt).

Die Gegenüberstellung der Anteile der Proteinfraktion an der Summe des extrahierten ^{15}N für die Versuchsjahre 2009 und 2010 (Abb. 47) zeigt viele Übereinstimmungen mit der Gesamt-N-Verteilung in den Proteinfractionen (Abb. 41). Aufgrund der schwachen Datenlage 2009 sind im Fall von 'Bomi' keine gesicherten Aussagen zum Einfluss des Prüffaktors Versuchsjahr zu treffen, doch sind erhebliche Unterschiede unwahrscheinlich. Auch Risø 16 zeigt keinerlei signifikante Differenzen der Mittelwerte zwischen 2009 und 2010. Für Risø 13 hingegen ergibt sich 2010 ein deutlich anderes Bild als im Vorjahr, mit einem Plus von 10,7 % und 10,3 % in der AG- bzw. GLU-Fraktion sowie einem Rückgang des Anteils der HOR von 66,7 % auf 45,7 %. Der Vergleich der Genotypen 2010 (20 dpa) zeigt mit Ausnahme der Hordeine keinen Unterschied zwischen 'Bomi' und Risø 16 mit 10 % mehr $^{15}\text{N}_{\text{HOR}}$ beim Wildtyp. Risø 13 übertraf dagegen die anderen Genotypen hinsichtlich des ^{15}N -Anteils in der AG- und GLU-Fraktion und zeigte den niedrigsten Beitrag der Hordeinfraction. Dies ist wie bereits diskutiert wahrscheinlich durch Extraktionsfehler bei den Hordeinen 2010 bedingt.

Die Interpretation der Anteile der Proteinfraktion an der Summe des extrahierten proteinogenen ^{15}N erfordert den Einbezug dieses Gesamt- ^{15}N (Tab. 12). Es bestanden diesbezüglich weder zwischen den Genotypen 2009, noch beim Vergleich der Versuchsjahre deutliche Unterschiede. Im Versuchsjahr 2010 war die Summe des proteinogenen ^{15}N bei Risø 13 gegenüber 'Bomi' und Risø 16 deutlich niedriger. Für den ^{15}N -Überschuss im Gesamtdosperm (Tab. 9) war dies jedoch nicht zu beobachten.

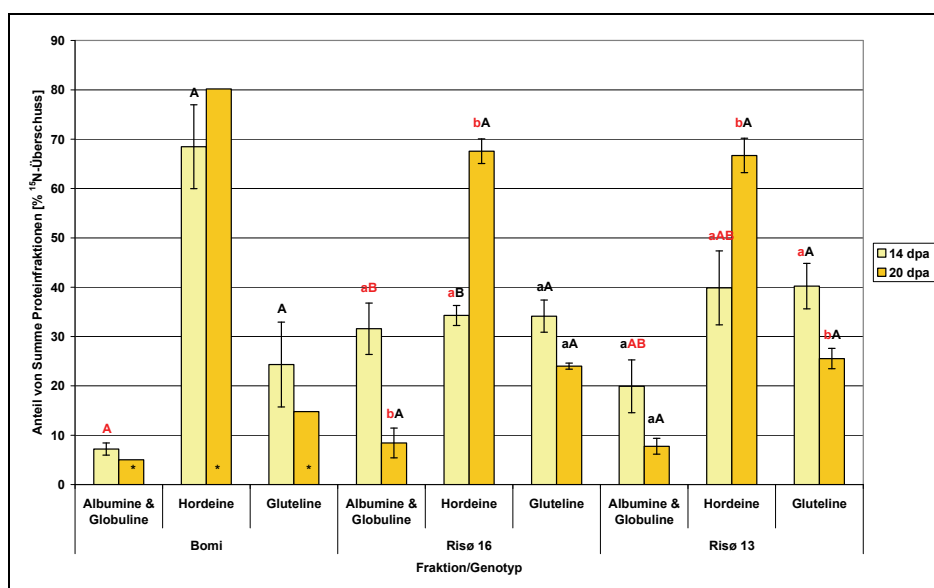


Abb. 46: Prozentualer Anteil der Proteinfraktion an der Summe des extrahierten ^{15}N aller drei Proteinfraktionen des Endosperms (Haupttrieb) der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 14 sowie 20 dpa im ersten Hauptversuch 2009. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Probenahmetermine für eine Fraktion eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für eine Fraktion zu einem Probenahmetermin; *n < 3)

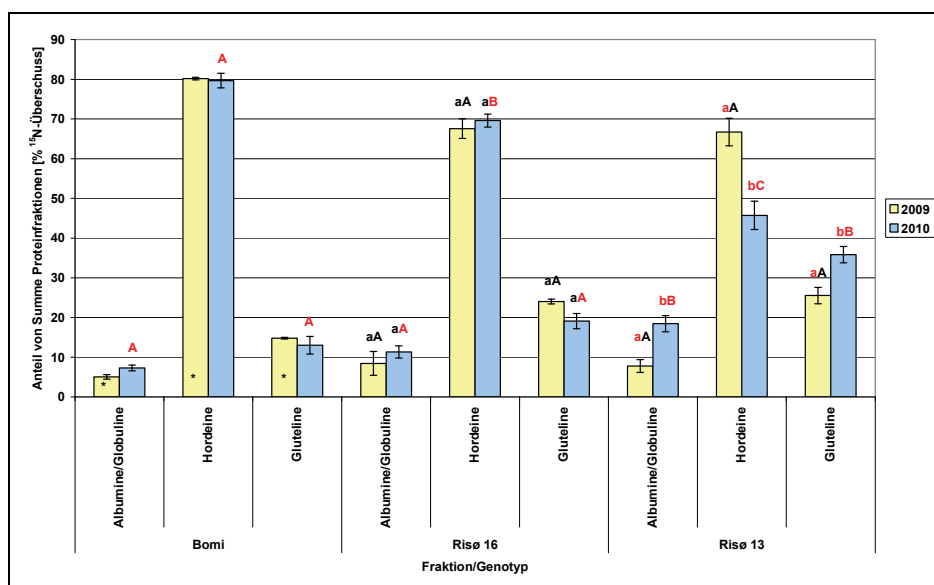


Abb. 47: Vergleich der prozentualen Anteile der Proteinfraktion an der Summe des extrahierten ^{15}N aller drei Proteinfraktionen aus den Versuchsjahren 2009 und 2010 für den Zeitpunkt 20 dpa. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Versuchsjahre für eine Fraktion eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für eine Fraktion eines Versuchsjahres)

Tab. 12: Gesamt-extrahierter proteinogener ^{15}N [μg] pro Endosperm für die Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 in den Versuchsjahren 2009 (14 und 20 dpa) und 2010 (20 dpa). (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben – Vergleich der Genotypen für einen Probenahmetermin eines Versuchsjahres, Großbuchstaben – Vergleich der Versuchsjahre für einen Genotyp zu 20 dpa)

Genotyp	^{15}N pro Endosperm extrahiert [μg]		
	2009 - 14 dpa	2009 - 20 dpa	2010 - 20 dpa
'Bomi'	$6.79 \pm 1,50^a$	$8,10 \pm 0,67^{aA}$	$8,41 \pm 0,33^{aA}$
Risø 16	$4,94 \pm 0,61^a$	$8,59 \pm 1,91^{aA}$	$7,22 \pm 0,53^{abA}$
Risø 13	$5,55 \pm 0,45^a$	$6,45 \pm 1,27^{aA}$	$5,67 \pm 0,84^{bA}$

4.1.9 Proteinextraktion - Reinheit der Fraktionen und N-Wiederfindung

Die wichtigsten Parameter, welche die Güte des Protokolls zur sequenziellen Fraktionierung des Endosperms hinsichtlich der Proteinfractionen beschreiben, sind in Tab. 13 und Tab. 14 zusammengefasst.

Es ist zu erkennen, dass die Reinheit der HOR-Fractionen mit Werten von 53,5 bis 98,6 % über alle Varianten hinweg am höchsten war, während die AG-Fraktion relativ zur Trockenmasse am wenigsten Protein enthielt (30,2 - 13,4 %). Die Gluteline (23,5 - 45,7 %) wiesen ebenfalls relativ starke Verunreinigungen durch Nicht-Protein-Substanzen auf. Weiterhin fällt auf, dass 2009 die Reinheit der AG- und GLU-Fraktion tendenziell und in einigen Fällen auch signifikant von 14 zu 20 dpa abnahm, während jene der HOR-Fraktion dazu tendierte, anzusteigen. Bei dem Vergleich der Versuchsjahre sticht die sehr geringe Verunreinigung der Hordeine bei 'Bomi' und Risø 16 2010 hervor, jedoch trat bei Risø 13 ein entgegengesetzter Effekt auf.

Die Daten in Tab. 14 zeigen, dass im Mittel 50 - 63 % des im Endosperm enthaltenen Stickstoffs in der Summe der drei Proteinfractionen wiedergefunden wurde. Im ersten Hauptversuch bestand der Trend zu einer höheren Wiederfindungsrate zu 20 dpa gegenüber 14 dpa. Im Fall von 'Bomi' war dieser Unterschied signifikant. Bei dem Vergleich der Versuchsjahre (20 dpa) war für 'Bomi' und Risø 16 eine deutlich niedrigere N-Wiederfindung 2010 zu verzeichnen und tendenziell traf dies auch bei Risø 13 zu. Dabei ist zu beachten,

dass die Einwaagen 2010 im Mittel aller Genotypen um 106 mg niedriger waren. Der Korrelationskoeffizient (r nach Pearson) der Parameter 'Einwaage für die Proteinextraktion' und 'N-Wiederfindungsrate' beträgt für die Gesamtheit der Daten 2009 (alle Genotypen und Probenahmeterminen) 0,735 und ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant. Dies bedeutet, dass ein linearer Zusammenhang zwischen beiden Parametern besteht bzw., dass die N-Wiederfindungsrate mit der Höhe der Einwaage linear ansteigt. Die Regressionsgerade für diesen Zusammenhang wird durch die Funktion $y = 0,071x + 42,584$ beschrieben (nicht dargestellt). Das Bestimmtheitsmaß (korrigiertes r^2) dieses Modells liegt bei 0,514, was bedeutet, dass noch andere Faktoren neben der Extraktionseinwaage zur Variabilität der N-Wiederfindung beitragen. Eine Wiederfindungsrate von 80 % würde unter Zuhilfenahme dieses Modells eine Einwaage von 527 mg erfordern. Dieser Wert ist mit den 10 mittleren Endospermen eines Haupttriebes weder für 14 dpa noch 20 dpa erreichbar. Eine vollständige Wiederfindung des im Endosperm enthaltenen Stickstoffs ist mit dem verwendeten Protokoll in keinem Fall möglich, da NPN-Verbindungen wie etwa freie Aminosäuren nicht erfasst werden.

Tab. 13: Reinheit der Proteinfractionen in Prozent Protein (N-Menge * 6,83) von der Trockenmasse der Fraktionen Albumine/Globuline, Hordeine und Gluteline für die Versuchsjahre 2009 (14, 20 dpa) und 2010 (20 dpa). (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben – Vergleich einzelner Fraktionen 2009 zu 14 und 20 dpa, Großbuchstaben – Vergleich Versuchsjahre zu 20 dpa)

Jahr	dpa	Reinheit der Proteinfraction [% Protein pro TM Fraktion]								
		'Bomi'			Risø 16			Risø 13		
		AG	HOR	GLU	AG	HOR	GLU	AG	HOR	GLU
2009	14	30,2 ± 1,1 ^a	53,5 ± 6,1 ^a	29,8 ± 6,2 ^a	25,6 ± 2,0 ^a	64,7 ± 4,0 ^a	23,5 ± 1,1 ^a	26,2 ± 3,5 ^a	69,7 ± 12,0 ^a	45,7 ± 3,2 ^a
	20	14,4 ± 1,1 ^{ba}	68,0 ± 3,5 ^{aA}	29,5 ± 5,0 ^{aA}	13,4 ± 1,1 ^{ba}	85,0 ± 1,4 ^{ba}	25,0 ± 1,9 ^{aA}	16,6 ± 2,0 ^{aA}	86,7 ± 3,5 ^{aA}	29,9 ± 5,0 ^{ba}
2010	20	25,9 ± 4,0 ^B	98,6 ± 0,6 ^B	33,7 ± 4,3 ^A	15,8 ± 1,1 ^A	94,8 ± 1,0 ^B	40,5 ± 2,2 ^B	16,7 ± 0,9 ^A	66,6 ± 1,9 ^B	28,3 ± 1,8 ^A

Tab. 14: N-Wiederfindung in der Summe der extrahierten Fraktionen pro Endosperm gegenüber der N-Menge pro Endosperm (100 %) für die Versuchsjahre 2009 (14, 20 dpa) und 2010 (20 dpa). (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben – Vergleich der Probenahmeterminen 14 und 20 dpa in 2009 je Genotyp, Großbuchstaben – Vergleich der Versuchsjahre zu 20 dpa)

Jahr	dpa	N-Wiederfindung [%]		
		‘Bomi’	Risø 16	Risø 13
2009	14	50,1 ± 2,5 ^a	52,8 ± 3,6 ^a	54,4 ± 0,6 ^a
	20	62,6 ± 1,1 ^{bA}	61,5 ± 0,6 ^{aA}	60,6 ± 2,7 ^{aA}
2010	20	56,1 ± 1,4 ^B	52,9 ± 2,5 ^B	52,2 ± 4,9 ^A

4.1.10 Einfluss der ¹³C-/¹⁵N-Doppelmarkierung

Für die Untersuchung der Frage, welchen Einfluss die *in vivo* ¹³C- und ¹⁵N-Doppelmarkierung auf den Haupttrieb der Pflanze hat, wurden 2009 markierte und unmarkierte Pflanzen zum Zeitpunkt 8 dpa verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Markierung sich nicht auf die Trockenmassen, sowie die C- und N-Massenanteile in den Blättern, Sprossachsen und Endospermen der Genotypen ‘Bomi’, Risø 16 und Risø 13 auswirkt (nicht dargestellt). Die einzige Ausnahme stellte die Sprossachse von ‘Bomi’ dar, welche bei der unmarkierten Variante deutlich niedriger ausfiel (- 0,4 mg). Ebenso wurden in keinem Fall hinsichtlich der C- und N-Mengen [mg] Unterschiede festgestellt. Die Überschüsse und Massenanteile der stabilen Isotope waren hingegen bei markierten Pflanzen aller Genotypen in jedem Organ signifikant erhöht, was den Erfolg der Behandlung zeigt. Durch Probenausfälle im Zuge der ¹³C-Bestimmung fehlen jedoch die Werte der unmarkierten Pflanzen für die Sprossachse, so dass in diesem Fall keine Aussage getroffen werden kann. Der mittlere ¹³C- und ¹⁵N-Überschuss (Atom-%) in den Organen markierter und unmarkierter Pflanzen aus dem Versuchsjahr 2009 ist in Tab. 15 dargestellt.

Tab. 15: ^{13}C - und ^{15}N Anreicherung ($\pm\text{SE}$) in Sprossachse, Blättern und Endosperm (Haupttrieb, 2009) markierter bzw. unmarkierter Pflanzen der Genotypen 'Bomi', Risø 16 sowie Risø 13. Die Unterschiede zwischen markierter und unmarkierter Variante pro Organ eines Genotyps sind in allen untersuchten Fällen signifikant (t-Test nach Student; $\alpha = 0,05$)

Genotyp	Organ	Behandlung	^{13}C -Überschuss [Atom-%]	^{15}N -Überschuss [Atom-%]
'Bomi'	Sprossachse	um	k. A.	$0,036 \pm 0,003$
		m	$0,011 \pm 0,000$	$0,529 \pm 0,078$
	Blätter	um	$0,004 \pm 0,002$	$0,019 \pm 0,003$
		m	$0,013 \pm 0,000$	$0,218 \pm 0,018$
	Endosperme	um	$0,016 \pm 0,002$	$0,042 \pm 0,005$
		m	$0,052 \pm 0,005$	$3,169 \pm 0,258$
Risø 16	Sprossachse	um	k. A.	$0,026 \pm 0,003$
		m	$0,011 \pm 0,001$	$0,464 \pm 0,051$
	Blätter	um	$0,006 \pm 0,001$	$0,032 \pm 0,004$
		m	$0,013 \pm 0,001$	$0,240 \pm 0,020$
	Endosperme	um	$0,014 \pm 0,000$	$0,031 \pm 0,004$
		m	$0,042 \pm 0,005$	$2,648 \pm 0,264$
Risø 13	Sprossachse	um	k. A.	$0,034 \pm 0,003$
		m	$0,010 \pm 0,001$	$0,530 \pm 0,050$
	Blätter	um	$0,008 \pm 0,001$	$0,032 \pm 0,001$
		m	$0,015 \pm 0,001$	$0,236 \pm 0,012$
	Endosperme	um	$0,014 \pm 0,000$	$0,034 \pm 0,003$
		m	$0,052 \pm 0,007$	$2,982 \pm 0,136$

4.2 Untersuchungen an den Bestockungstrieben

In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus der Untersuchungen auf dem Haupttrieb, welcher als repräsentativ für die Gesamtpflanze angenommen wurde. Die Bestockungstriebe wurden ebenfalls in die Bestandteile Sprossachse, Blätter, Fahnenblatt und Ähre separiert und anschließend erfolgte die Bestimmung der Trockenmasse. Dies ermöglicht es zu prüfen, ob deren Entwicklung vom Haupttrieb abweicht.

Wie aus den Werten aus Tab. 16 ersichtlich, war in allen untersuchten Fällen eine deutlich höhere Bestockung zu beobachten, als sie unter Feldbedingungen bei Gerste auftritt. In diesem Zusammenhang konnte eine abweichende Entwicklungsdynamik beobachtet werden. Dies äußerte sich darin, dass die Pflanzen nicht zuerst bestockten und dann zum Schossen übergingen, sondern die Bestockung auch nach dem Einsetzen des Schossens bis zur Anthese andauerte. Dabei ist zu beachten, dass die Umweltbedingungen im Gewächshaus von jenen im Feld abweichen und mit Solitärpflanzen gearbeitet wurde. Der Vergleich der Genotypen offenbarte in beiden Versuchsjahren keine Unterschiede bezüglich der mittleren Anzahl an Bestockungstrieben (Tab. 16). Hierbei ist anzumerken, dass für 'Bomi' 2010 aufgrund eines Fehlers bei der Koordination der Probenaufarbeitung nur ein Wert vorhanden ist. Ebenso konnten im ersten Hauptversuch keine Abweichungen zwischen den Probenahmetermeninien registriert werden, womit davon ausgegangen werden kann, dass mindestens ab 8 dpa keine zusätzlichen Bestockungstriebe mehr gebildet wurden (nicht dargestellt). Die Gegenüberstellung der Versuchsjahre zeigt jedoch 2010 eine deutlich stärkere Bestockung, auch wenn dies im Fall von 'Bomi' nicht statistisch auszuwerten ist.

Tab. 16: Mittlere Anzahl an Bestockungstrieben pro Pflanze aus den Versuchen 2009 (8, 14, 20 dpa) und 2010 (20 dpa) für die Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Genotypen je Probenahmetermin eines Versuchsjahres, Großbuchstaben - Vergleich der Versuchsjahre zu 20 dpa je Genotyp; *n < 3)

Genotyp	Anzahl Bestockungstriebe Pro Pflanze			
	2009			2010
	8 dpa	14 dpa	20 dpa	20 dpa
'Bomi'	23 ± 0 ^a	24 ± 2 ^a	25 ± 2 ^a	34 *
Risø 16	23 ± 2 ^a	25 ± 1 ^a	25 ± 1 ^{a A}	31 ± 1 ^{a B}
Risø 13	25 ± 1 ^a	26 ± 1 ^a	23 ± 1 ^{a A}	32 ± 1 ^{a B}

Die Trockenmassen der Sprossachsen der Bestockungstriebe von Pflanzen aus dem ersten Hauptversuch (Tab. 17) stiegen im Zeitraum von 8 zu 20 dpa. Dies war mit Ausnahme von Risø 13 am Haupttrieb nicht zu beobachten. Ein Einfluss des Probenahmetermins bezüglich der Blatttrockenmasse konnte hingegen weder am Haupt-, noch den Bestockungstrieben festgestellt werden (vgl. Abb. 8) was für die Repräsentativität des Haupttriebes für die Gesamtpflanze spricht. Weiterhin war ein stetiger Anstieg der Trockenmasse der reproduktiven Organe von 8 über 14 zu 20 dpa sowohl bei den Haupt-, als auch den Bestockungstrieben zu verzeichnen, obgleich der Zuwachsfaktor bei ersterem deutlich höher ausfiel (vgl. Abb. 48 und Abb. 27). In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass die Anthese der Bestockungstriebe meist zeitlich verzögert gegenüber dem Haupttrieb einsetzt. Betrachtet man die Summe der Trockenmassen aller Organe der Bestockungstriebe, so erkennt man zum einen, dass ein Einfluss des Probenahmetermins bei allen Genotypen zwischen 14 dpa und 20 dpa vorhanden war, welcher vor allem durch den Zuwachs an den Ähren begründet sein dürfte. Zum anderen wird deutlich, dass auf dieser Ebene nur zwischen den beiden Mutanten zu 14 und 20 dpa ein deutlicher Unterschied zu verzeichnen war, wobei die Gesamt-Trockenmasse bei Risø 13 geringer ausfiel. Ergänzend ist anzumerken, dass die Trockenmassen der Blätter und Fahnenblätter 2009 in allen Fällen die gleiche Dynamik hinsichtlich der Trockenmassebildung zeigten.

Tab. 17: Mittlere Trockenmassen (\pm SE) der Organe der Bestockungstriebe von Pflanzen der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 aus 2009 für die Zeitpunkte 8, 14 und 20 dpa. (Homogene Gruppen: Großbuchstaben – Vergleich Genotypen je Organ zu einem Probenahmetermin, Kleinbuchstaben – Vergleich der Probenahmetermine je Organ eines Genotyps)

Organ	Genotyp	Trockenmasse in [g]		
		8 dpa	14 dpa	20 dpa
Sprossachsen	'Bomi'	8,0 \pm 0,5 ^{aA}	11,0 \pm 0,4 ^{bA}	11,5 \pm 0,6 ^{bA}
	Risø 16	6,9 \pm 0,4 ^{aA}	11,1 \pm 0,8 ^{bA}	13,1 \pm 1,1 ^{bA}
	Risø 13	7,2 \pm 0,2 ^{aA}	9,4 \pm 0,6 ^{bA}	12,3 \pm 0,3 ^{cA}
Blätter	'Bomi'	16,8 \pm 0,2 ^{aA}	18,4 \pm 0,5 ^{aA}	18,3 \pm 0,7 ^{aA}
	Risø 16	16,4 \pm 0,7 ^{aA}	18,7 \pm 0,5 ^{aA}	17,7 \pm 0,4 ^{aA}
	Risø 13	17,5 \pm 0,6 ^{aA}	16,8 \pm 1,1 ^{aA}	15,0 \pm 0,5 ^{aB}
Fahnenblätter	'Bomi'	2,0 \pm 0,1 ^{aA}	2,2 \pm 0,1 ^{aA}	2,0 \pm 0,1 ^{aA}
	Risø 16	2,1 \pm 0,1 ^{aA}	2,4 \pm 0,2 ^{aA}	2,3 \pm 0,1 ^{aA}
	Risø 13	1,9 \pm 0,0 ^{aA}	2,0 \pm 0,2 ^{aA}	1,6 \pm 0,2 ^{aB}
Ähren	'Bomi'	4,0 \pm 0,3 ^{aA}	8,7 \pm 0,4 ^{bA}	11,6 \pm 0,7 ^{cA}
	Risø 16	3,6 \pm 0,5 ^{aA}	8,7 \pm 0,4 ^{bA}	11,6 \pm 0,8 ^{cA}
	Risø 13	4,1 \pm 0,4 ^{aA}	7,3 \pm 1,0 ^{bA}	9,7 \pm 0,8 ^{bA}
Summe aller Organe	'Bomi'	30,7 \pm 0,8 ^{aA}	33,8 \pm 0,7 ^{aAB}	43,3 \pm 1,1 ^{bAB}
	Risø 16	29,1 \pm 1,4 ^{aA}	34,6 \pm 1,2 ^{aA}	44,7 \pm 2,0 ^{bA}
	Risø 13	30,8 \pm 0,9 ^{aA}	30,3 \pm 1,3 ^{aB}	38,6 \pm 1,1 ^{bB}

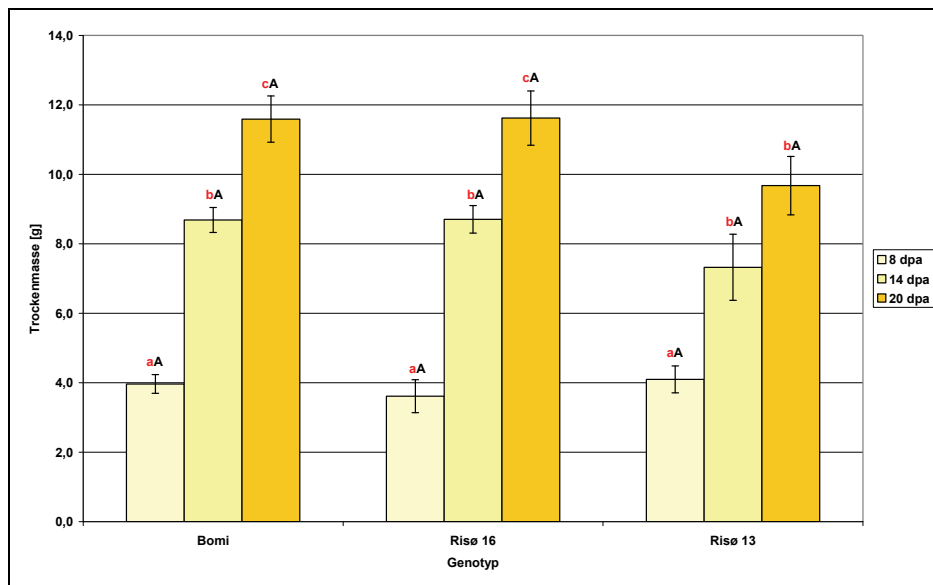


Abb. 48: Trockenmassen der Ähren (\pm SE) aller Bestockungstriebe von Pflanzen der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 aus dem ersten Hauptversuch 2009. (Homogene Gruppen: Kleinbuchstaben - Vergleich der Probenahmeterminale eines Genotyps, Großbuchstaben - Vergleich der Genotypen für einen Probenahmetermin)

Beim Vergleich der Versuchsjahre 2009 und 2010 für den Zeitpunkt 20 dpa (Tab. 18) zeigen sich für die Trockenmasse der Sprossachse weder signifikante Unterschiede hinsichtlich des Genotyps noch des Probenahmetermins. Für die Blätter der Bestockungstriebe fiel diese hingegen 2010 sowohl beim Wildtyp als auch den Mutanten höher aus. Im Gegensatz dazu wurde bei den Haupttrieben eine Tendenz zu geringeren Trockenmassen bei Sprossachsen und Blättern beobachtet (Abb. 9). In diesem Zusammenhang sei auf die höhere Anzahl an Bestockungstrieben 2010 verwiesen, welche die höhere Blatttrockenmasse erklärt und gleichzeitig zu einer Verringerung der Einzeltriebtrockenmasse geführt haben kann, da das Nährstoffangebot nicht erhöht war. Wie aus Tab. 18 ersichtlich, war die Trockenmasse der Ähren 2010 gegenüber 2009 bei allen Genotypen erniedrigt, doch betrachtet man die Summe aller Organe, so wurden im zweiten Jahr tendenziell, und im Fall von Risø 13 deutlich höhere Werte erreicht. Der Unterschied zwischen den Mutanten in 2009 zu 20 dpa wurde 2010 nicht mehr festgestellt. Eine solche Angleichung wurde auch für die Haupttriebe beobachtet (z. B. Abb. 9 und Abb. 11).

Tab. 18: Mittlere Trockenmassen (\pm SE) der Organe der Bestockungstriebe von Pflanzen der Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 aus den Versuchsjahren 2009 und 2010 zum Zeitpunkt 20 dpa. (Homogene Gruppen: Großbuchstaben – Vergleich der Versuchsjahre je Organ eines Genotyps, Kleinbuchstaben – Vergleich der Genotypen je Organ und Versuchsjahr)

Organ	Genotyp	Trockenmasse [g]	
		2009	2010
Sprossachsen	'Bomi'	11,5 \pm 0,6 ^{a A}	12,0 \pm 0,6 ^{a A}
	Risø 16	13,1 \pm 1,1 ^{a A}	13,1 \pm 0,6 ^{a A}
	Risø 13	12,3 \pm 0,3 ^{a A}	12,5 \pm 0,5 ^{a A}
Blätter	'Bomi'	18,3 \pm 0,7 ^{a A}	24,3 \pm 0,5 ^{a B}
	Risø 16	17,7 \pm 0,4 ^{a A}	22,9 \pm 0,5 ^{a B}
	Risø 13	15,0 \pm 0,5 ^{b A}	23,3 \pm 0,5 ^{a B}
Fahnenblätter	'Bomi'	2,0 \pm 0,1 ^{a A}	2,6 \pm 0,1 ^{a B}
	Risø 16	2,3 \pm 0,1 ^{a A}	3,0 \pm 0,1 ^{a B}
	Risø 13	1,6 \pm 0,2 ^{b A}	2,7 \pm 0,1 ^{a B}
Ähren	'Bomi'	11,6 \pm 0,7 ^{a A}	7,8 \pm 0,4 ^{a B}
	Risø 16	11,6 \pm 0,8 ^{a A}	8,0 \pm 0,3 ^{a B}
	Risø 13	9,7 \pm 0,8 ^{a A}	8,7 \pm 0,3 ^{a A}
Summe Organe	'Bomi'	43,3 \pm 1,1 ^{ab A}	46,7 \pm 1,4 ^{a A}
	Risø 16	44,7 \pm 2,0 ^{a A}	47,0 \pm 0,6 ^{a A}
	Risø 13	38,6 \pm 1,1 ^{b A}	47,2 \pm 0,8 ^{a B}

5 Diskussion

5.1 Trockenmasse

Vegetative Organe

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zum einen die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Kohlenstoff- und Stickstoffverlagerungen im Haupttrieb von Gerstenpflanzen im frühen Zeitraum nach der Anthese. Zum anderen sollte die Auswirkung der gestörten Stärkesynthese im Endosperm bei den verwendeten Mutanten auf diese Prozesse im Vergleich zum Wildtyp geklärt werden.

Der Parameter Trockenmasse integriert alle stofflichen Bestandteile der Biomasse und ist daher geeignet, sich einen ersten Überblick zu verschaffen. Weiterhin ist es möglich, dass im Rahmen der Erzeugung der bekannten Mutationen bei Risø 13 und Risø 16 durch den schnellen Neutronenbeschuss bzw. die chemische Behandlung weitere Veränderungen des Erbgutes verursacht wurden, die sich phänotypisch in der Entwicklung der Pflanze bemerkbar machen. Hierzu wurden in der Literatur keine Angaben gefunden.

Die Trockenmasse der vegetativen Organe des Haupttriebes sowie der Bestockungstriebe wurde nicht durch den Prüffaktor Genotyp beeinflusst. Eine Ausnahme bilden die Blätter der Bestockungstriebe von Risø 13 zu 20 dpa im ersten Hauptversuch, welche eine niedrigere Trockenmasse als jene von Risø 16 und 'Bomi' aufwiesen. Dieser Unterschied existierte jedoch 2010 nicht und ist daher sehr wahrscheinlich nicht durch genetische Faktoren, sondern durch die Umweltbedingungen verursacht. Für die Anzahl an Bestockungstrieben ließen sich ebenfalls keine genotypischen Besonderheiten verzeichnen. Somit bestanden keine deutlichen Abweichungen der Mutanten vom Wildtyp bezüglich des Phänotyps der vegetativen Organe.

Im ersten Hauptversuch (2009) erfolgte die Beprobung der Pflanzen zu den Terminen 8, 14 und 20 Tage nach Anthese. Für die Blatttrockenmasse der Haupttriebe zeigte sich keine Wirkung des Prüffaktors Probenahmetermin. Gleiches gilt für die Sprossachsen, mit Ausnahme der Mutante Risø 13. Bei dieser war eine deutliche Zunahme von 8 zu 20 dpa zu verzeichnen und zu 20 dpa bestand der Trend zu einem höheren Mittelwert gegenüber 'Bomi' und

Risø 16. Auch 2010 wurde bei Risø 13 zu 20 dpa der tendenziell höchste Wert festgestellt. Somit handelte es sich sehr wahrscheinlich nicht um ein temporäres Phänomen. Da jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zu den anderen Genotypen bestanden, sind weitere Untersuchungen notwendig, um eine klare Aussage zu treffen, ob sich Risø 13 vom Wildtyp hinsichtlich der Entwicklung nach der Sprossachse nach der Anthese unterscheidet. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass anhand der Trockenmasse keine Aussagen zu treffen sind, inwiefern in den vegetativen Organen gespeicherter Kohlen und/oder Stickstoff ins Endosperm verlagert wurde.

Der Vergleich der Versuchsjahre hinsichtlich der Trockenmasse der vegetativen Organe des Haupttriebes zeigt, dass die Ergebnisse reproduziert werden konnten. Es wurde in beiden Versuchen zu 20 dpa kein Einfluss des Genotyps festgestellt. Im zweiten Hauptversuch bestand die Tendenz zu etwas geringeren Trockenmassen. Eine mögliche Ursache ist die etwas verkürzte Photoperiode 2010, welche durch den Versatz des Zeitraums der künstlichen Beleuchtung um eine Stunde verursacht wurde (siehe Tab. 2). Wahrscheinlich handelt es sich jedoch um ein Ergebnis der Summe aller Umweltbedingungen, welche in einem Gewächshausversuch nicht vollständig regelbar sind. Die Trockenmasse der Sprossachsen von den Bestockungstrieben unterschied sich ebenfalls nicht zwischen den Versuchsjahren, die der Blätter fielen 2010 jedoch höher aus. Dies ist, zumindest teilweise, durch stärkere Bestockung im zweiten Hauptversuch erklärbar.

Endosperm

Die Untersuchung der Trockenmassen der Endosperme zeigt, dass diese im untersuchten Zeitraum von 8 über 14 zu 20 Tagen nach Anthese bei 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 linear zunahm. Zwischen den Genotypen entwickelten sich dabei ab 14 dpa zunehmend Unterschiede, während diese zu 8 dpa noch nicht vorhanden waren. Betrachtet über alle Termine wurde festgestellt, dass sich 'Bomi' mit höheren Trockenmassen von den Mutanten abhob, während letztere kaum voneinander abwichen. Die Frischmassen der Endosperme stiegen im untersuchten Zeitraum in geringerem Maße als die Trockenmasse an, zeigten jedoch keinen deutlichen Einfluss des Faktors Genotyp. Der Wasserge-

halt verhielt sich folglich gegenläufig zur Trockenmasse. Die Schlussfolgerung hieraus ist, dass die Körner der drei Genotypen dieselbe *Sink*-Kapazität besaßen, 'Bomi' allerdings besser in der Lage war, Kohlen- und/oder Stickstoff einzulagern. Generell lassen die Werte der Trockenmasse zu 8 und 20 dpa sowie der starke Anstieg in der Zwischenzeit darauf schließen, dass der Untersuchungszeitraum einen Großteil der linearen Kornfüllungsphase widerspiegelt. In Gegenüberstellung mit der Konstanz der Trockenmasse der vegetativen Organe ergibt sich, dass die im Endosperm eingelagerten Stoffe aus der aktuellen Assimilation stammen müssen. Ist dies nicht der Fall und es erfolgte eine Remobilisierung von Substanzen mit anschließender Verlagerung ins Endosperm, so wurden diese in der Trockenmassebilanz vollständig durch neue Assimilate ersetzt.

Die Trockenmassen reifer Körner der Mutanten Risø 16 und Risø 13 betragen laut Literatur 72 % bzw. 74 % vom Wildtyp [31, 32]. In der vorliegenden Arbeit wurden zum Zeitpunkt 20 dpa mittlere Trockenmassen der Endosperme in Höhe von 82,9 % bei Risø 16 und 84,2 % für Risø 13 in Relation zu 'Bomi' ermittelt (2009 und 2010). Dies deutet darauf hin, dass die beschriebenen Verhältnisse bestätigt werden können, obgleich ein direkter Vergleich der Werte nicht möglich ist. Demgegenüber stehen jedoch die Trockenmassen, die für die Inhaltstoffanalyse im reifen Korn bestimmt wurden (Tab. 10). Diese betrugen 100 % und 64 % von 'Bomi' bei Risø 16 bzw. Risø 13. Dieses Ergebnis für Risø 16 steht im Gegensatz zu den Literaturangaben. Sofern kein Versuchsfehler vorliegt, bedeutet dies, dass die Mutante in der Lage war, im Zeitraum zwischen 20 dpa und der Reife in stärkerem Maße als 'Bomi' Stoffe im Korn einzulagern bzw. die Kornfüllung in gleichem Ausmaß erfolgte, jedoch mit einem zeitlich verzögerten Verlauf. Weiterhin ist der Ausfall der zytosolischen AGPase hinsichtlich der Trockenmasse vollständig kompensiert worden. Mögliche Mechanismen hierfür sind eine erhöhte Aktivität der plastidären AGPase und Stoffeinlagerung in andere Fraktionen wie Lipide und Proteine.

5.2 Gesamt-C

Vegetative Organe

Die Gesamt-Kohlenstoffmenge ist ein Parameter, welcher eng mit der Trockenmasse verbunden ist, da Kohlenstoff das dominante Element der Biomasse ist. Erwartungsgemäß zeigen die Ergebnisse dieser Analysen eine hohe Analogie zu jenen der Trockenmasse. Für die vegetativen Organe der Haupttriebe des ersten Hauptversuches wurden keinerlei Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt und bezüglich der Auswirkung des Faktors Probenahmetermin konnte wiederum nur für die Sprossachse von Risø 13 ein deutlicher Zuwachs von 8 zu 20 dpa verzeichnet werden. Wie aus Abb. 10 ersichtlich lagen die Werte der Blätter von 'Bomi' zu 14 dpa tendenziell unter allen anderen Blattwerten. Im Abgleich mit den Trockenmassewerten für diese Proben ist jedoch mit großer Sicherheit davon auszugehen, dass es sich um einen Analysefehler handelt. Dieser Fehler setzt sich entsprechend der Berechnungsformeln in den Werten der Kohlenstoffmassenanteile und den ^{13}C -Parametern fort und wird daher nachfolgend nicht erneut diskutiert. Eine Auswirkung des verminderten Vermögens von Risø 16 zur Synthese transitorischer Stärke in den Blättern [80] auf die Kohlenstoffmenge in den vegetativen Organen wurde bei dem Vergleich mit den anderen untersuchten Genotypen nicht festgestellt. In vorangegangenen Studien an Soja [82], Mais [83] und Weizen [84] wurde der Beitrag des vor Anthese akkumulierten Kohlenstoffs zur Kornfüllung mit 4 %, 10 % und 29 % bestimmt. Für Gerste betrug der Anteil des vor Anthese assimilierten Kohlenstoffs 74 %, jedoch waren die Pflanzen nach der Anthese Trockenstress ausgesetzt [85]. In der vorliegenden Arbeit wurde am Haupttrieb kein Rückgang der C-Mengen im untersuchten Zeitraum nach der Anthese festgestellt und somit auch keine Remobilisierung von Kohlenstoff. Dies bedeutet jedoch nicht, dass es keinen Beitrag remobilisierten Kohlenstoffs zur Kornfüllung gab, da durch aktuelle Assimilate ersetzter Kohlenstoff nicht "sichtbar" ist und auch der Beitrag der Wurzel sowie Bestockungstriebe nicht untersucht wurden. Der Beitrag der Wurzeln ist nach Literaturangaben jedoch als sehr gering einzuschätzen [84, 86]. Möglicherweise steigt die Bedeutung remobilisierter Assimilate erst nach 20 dpa mit fortschreitender Seneszenz der vegetativen Organe. Bestätigungen für diese

Annahme finden sich in der Literatur [124, 112, 121] und werden in Kapitel 5.9 eingehender diskutiert.

Die Kohlenstoffmassenanteile an der Trockenmasse der vegetativen Organe von Pflanzen aus dem ersten Hauptversuch zeigten entsprechend den zuvor beschriebenen Verhältnissen in allen Fällen keine Abweichungen zwischen den einzelnen Beprobungsterminen. Auch ein Einfluss des Faktors Genotyp konnte für kein Organ und zu keinem Probenahmetermin festgestellt werden. Sowohl beim Wildtyp, als auch den Mutanten lag der C-Massenanteil in den Blättern etwa 3 % niedriger als in den Sprossachsen des Haupttriebes. Dies ist durch die höhere Protein- bzw. Stickstoffmenge in den Blättern zu erklären, welche durch den hierin lokalisierten Photosyntheseapparat verursacht wird, insbesondere das Enzym Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase, dessen Anteil am Blattprotein mehr als 50 % betragen kann [81].

Der Vergleich der Kohlenstoffmengen in den Sprossachsen aus dem ersten und zweiten Hauptversuch für den Termin 20 dpa zeigt, dass diese 2010 wie auch die Trockenmasse geringer ausfielen. Während 2009 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen feststellbar waren, lag der Wert für Risø 13 im Wiederholungsversuch deutlich über dem von 'Bomi', während sich Risø 16 von keinem der beiden anderen Genotypen unterschied (Abb. 11). Dies ist sehr wahrscheinlich auf den höheren Stichprobenumfang ($n = 7$) im Wiederholungsversuch zurückzuführen. In der Tendenz, d. h. der höchste Wert bei Risø 13 und geringe Unterschiede zwischen 'Bomi' und Risø 16, gleichen sich die Ergebnisse beider Jahre. Dies belegt die Annahme, dass Risø 13 hinsichtlich der Wachstumsdynamik der Sprossachse nach der Anthese von den beiden anderen Genotypen abweicht. Die Kohlenstoffmengen in den Blättern unterscheiden sich in beiden Jahren kaum, obgleich ein direkter Vergleich nicht möglich ist. Wie schon im ersten Hauptversuch wurden 2010 keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt. Insgesamt bestätigen die Gesamt-Kohlenstoffmengen erneut, dass die Ergebnisse am Haupttrieb trotz nicht völlig identischer Umweltbedingungen reproduzierbar sind.

Hinsichtlich der Kohlenstoffmassenanteile an der Trockenmasse der Sprossachsen der Haupttriebe zeigten sich Unterschiede zwischen den Versuchsjah-

ren 2009 und 2010. Generell wurde eine Tendenz zu höheren Massenanteilen im zweiten Hauptversuch festgestellt, wobei die Zunahme bei Risø 13 signifikant ausfiel (Abb. 13). Dies ist teilweise durch eine Verringerung des C/N-Verhältnisses zu erklären (vgl. Abb. 21). Als weitere Ursachen kommen ein verringerter Anteil an Mineralstoffen und eventuell ein Versuchsfehler durch einen niedrigeren Restwassergehalt in den Sprossachsen aus dem Wiederholungsversuch 2010 in Frage. Obgleich Unterschiede in der Höhe der C-Massenanteile in den Sprossachsen aus dem ersten und zweiten Hauptversuch auftraten, wurden die Ergebnisse aus 2009 dahingehend bestätigt, dass in beiden Jahren kein signifikanter Einfluss des Prüffaktors Genotyp existierte. Gleiches gilt für die C-Massenanteile in den Blättern. Bei diesen glichen sich zudem die Werte aus beiden Versuchsjahren, unter der Annahme, dass die C-Massenanteile in den Fahnenblättern nicht von jenen in den übrigen Blättern des Haupttriebes abwichen.

5.3 ¹³C – Vier Tage vor Probenahme assimilierter Kohlenstoff

Durch die ¹³C-Pulsmarkierung wird eine Anreicherung des Kohlenstoffs im Blatt erreicht. Durch die vier Tage später erfolgte Probenahme und die Messung der Anreicherung in den verschiedenen Organen kann nachvollzogen werden, in welchem Ausmaß dieser aktuell assimilierte Kohlenstoff im Blatt verblieb oder in andere Organe, d. h. die Sprossachse und Endosperme verlagert wurde. Das Ziel ist vor allem, Informationen über den Beitrag der aktuellen Assimilation zur Füllung des Endosperms zu erhalten.

Vegetative Organe

Der ¹³C-Überschuss (µg) in den vegetativen Organen des Haupttriebes aus dem ersten Hauptversuch (Abb. 14) zeigte zahlreiche Übereinstimmungen mit den Gesamt-Kohlenstoffmengen. Ein Einfluss des Prüffaktors Genotyp konnte auch für die Verteilung des aktuell assimilierten Kohlenstoffs zu keinem Termin festgestellt werden. Der Faktor Probenahmetermin hatte 2009 keinen Effekt auf den ¹³C-Überschuss in den Blättern, wobei diese Aussage für Risø 13 aufgrund fehlender Werte durch Probenausfälle eine Vermutung darstellt. Für die Sprossachse zeigte sich jedoch bei allen drei Genotypen eine starke Tendenz zu steigenden Werten zwischen 8 und 14 dpa und minimalen

Veränderungen zwischen 14 und 20 dpa. Im Fall von 'Bomi' ist der Unterschied zwischen 8 und 20 dpa signifikant. Eine Erklärungsmöglichkeit ist, dass die ^{13}C -Assimilation zu 8 dpa geringer ausfiel. Die ^{13}C -Werte der Blätter geben jedoch keinen Hinweis darauf. Daher ist es wahrscheinlich, dass zu 8 dpa mehr ^{13}C in die Wurzeln und/oder Bestockungstriebe exportiert wurde, während zu 14 dpa und 20 dpa eine stärkere Einlagerung in die Sprossachse des Haupttriebes erfolgte. Alternativ ist es möglich, dass mit zunehmender *Sink*-Stärke des Haupttriebes im Zuge der Kornfüllung der Import von ^{13}C aus den Bestockungstrieben anstieg. Mögliche Interaktionen von Haupt- und Bestockungstrieben werden in Kapitel 5.9 diskutiert.

Für die ^{13}C -Massenanteile ergibt sich ein ähnliches Bild wie zuvor. Auch hier wurden keine genotypischen Unterschiede festgestellt, was bedeutet, dass Mutanten und Wildtyp sich bezüglich der Verteilung des aktuell assimilierten Kohlenstoffs in den vegetativen Organen, im Zeitraum nach der Anthese nicht unterschieden. Da der Anstieg des ^{13}C -Überschusses in den Sprossachsen zwischen 8 und 14 dpa stärker ausfiel als jener der Gesamt-Kohlenstoffmenge, stieg auch der ^{13}C -Massenanteil an der Trockenmasse in diesem Zeitraum tendenziell an. Zwischen 14 und 20 dpa stieg oder fiel der Massenanteil im Trend etwas, je nach dem Verhältnis der zuvor genannten Größen. Ein signifikanter Unterschied wurde jedoch nur für Risø 16 zwischen den Terminen 8 und 14 dpa festgestellt. Für die ^{13}C -Massenanteile in den Blättern bestand in keinem Fall ein Einfluss des Faktors Probenahmetermin.

Der Vergleich der Versuchsjahre hinsichtlich der ^{13}C -Überschusswerte in den Sprossachsen der Haupttriebe zeigt, dass diese wie auch die C-Mengen 2010 gegenüber 2009 geringer ausfielen (Abb. 11, Abb. 15). Dies erklärt sich durch die Berechnungsformel (Gl. 3.12), in welche die Gesamt-Kohlenstoffmenge eingeht. Sowohl im ersten, als auch im zweiten Hauptversuch wurde zu 20 dpa kein Einfluss des Faktors Genotyp nachgewiesen. Während die Gesamt-Kohlenstoffmenge 2010 zu diesem Termin bei Risø 13 signifikant höher als bei 'Bomi' ausfiel, wurde hinsichtlich der Einlagerung des vier Tage vor Probenahme assimilierten Kohlenstoffs kein solcher Unterschied festgestellt. Dies kann zum einen bedeuten, dass die vermutete stärkere Stoffeinlagerung in die Sprossachse bei Risø 13 nach der Anthese zwischen 16 und 20 dpa nicht

mehr auftritt und sich die Genotypen zu 20 dpa dahingehend nicht mehr unterscheiden. Die Unterschiede bezüglich des Gesamt-C reflektieren dementsprechend zum größten Teil die Summe der vor 16 dpa stattgefundenen Prozesse. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit besteht darin, dass der eingelagerte Kohlenstoff in stärkerem Maße aus den Bestockungstrieben remobilisiert wurde.

Für den ^{13}C -Massenanteil an der Trockenmasse der vegetativen Organe wurde in beiden Versuchsjahren kein Einfluss des Prüffaktors Genotyp festgestellt, jedoch fehlen die Werte für Risø 13 aus dem ersten Hauptversuch. Zwischen den Versuchsjahren bestanden ebenfalls keine deutlichen Unterschiede für die Sprossachse und auch für die Blätter sind trotz bedingter Vergleichbarkeit keine Abweichungen zu vermuten.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Sprossachsen eine stärkere Dynamik hinsichtlich C- und ^{13}C -Einlagerung im Zeitverlauf nach der Anthese zeigten, während bei den Blättern keine Veränderungen zu beobachten waren. Zwischen den Genotypen konnten keine bedeutsamen Abweichungen registriert werden und somit kann bei diesen von gleichen Kohlenstoff-*Source*-Verhältnissen im Hinblick auf die Kornfüllung ausgegangen werden. Zwischen den Versuchsjahren bestanden, vor allem hinsichtlich des ^{13}C -Massenanteils an der Trockenmasse keine größeren Abweichungen, was die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der ^{13}C -Pulsmarkierung belegt.

Endosperm

Die Betrachtung der ^{13}C -Anreicherung (Atom-%) in den Endospermen aus dem ersten Hauptversuch offenbart, dass zu keinem Zeitpunkt Unterschiede zwischen den Genotypen bestanden. Sowohl beim Wildtyp, als auch bei den Mutanten zeigt sich der gleiche zeitliche Verlauf für diese Größe, auch wenn die Unterschiede nicht in allen Fällen gesichert sind (Abb. 30). Es kam zwischen 8 und 14 dpa zu einem Anstieg und zwischen 14 und 20 dpa zu einer Abnahme der Anreicherung. Im Zeitraum von 4 bis 8 dpa befindet sich das Endosperm noch in der ersten Entwicklungsphase, verbunden mit Zellteilungen, Zellexpansion und der Bildung metabolischer Proteine, welche für die nachfolgende Synthese von Speicherstoffen notwendig sind [40, 41]. Da die

Stärkesynthese sich in der initialen Phase des sigmoiden Verlaufs befindet [47], ist die *Sink*-Stärke des Endosperms für Kohlenstoff noch gering und dementsprechend gelangt weniger des 4 Tage vor Probenahme assimilierten ^{13}C in das Endosperm. Die zweite Phase der Endospermentwicklung, die Kornfüllung, welche mit der massiven Einlagerung von Speicherstoffen verbunden ist, beginnt laut Literaturangaben ca. 10 Tage nach Anthese [41]. Somit fällt die zweite ^{13}C -Markierung zu 10 dpa bereits in diese hinein und es kommt zu einem stärkeren Fluss von Kohlenstoff ins Endosperm, was sich auch in einem Anstieg der ^{13}C -Anreicherung bemerkbar macht. Das Maximum der Stärkesynthese wird zwischen 16 und 22 dpa erreicht [47]. Die Abnahme der ^{13}C -Anreicherung zum letzten Probenahmetermin geht daher auf den Verdünnungseffekt zurück, d. h. es wird relativ mehr unmarkierter Kohlenstoff eingelagert, obgleich die absolute Menge ^{13}C im Endosperm eventuell noch zu ihrem Maximum ansteigt.

Der Vergleich der Versuchsjahre für den Termin 20 dpa hinsichtlich der ^{13}C -Anreicherung zeigt ein ähnliches Bild wie der ^{13}C -Überschuss in den vegetativen Organen, d. h. auch im Endosperm fielen die Werte 2010 tendenziell geringer aus. Im Fall von 'Bomi' nahm die Anreicherung drastisch ab (- 0,05 Atom-%). Dies lässt sich nicht vollständig durch eine starke Isotopenverdünnung erklären, da auch die Trockenmasse im zweiten Hauptversuch tendenziell niedriger lag als im Vorjahr. Als mögliche Ursachen sind eine stärkere Verlagerung des assimilierten ^{13}C zu alternativen Quellen, wie der Wurzel oder den Bestockungstrieben, eine geringe Aufnahme des angereicherten $^{13}\text{CO}_2$ oder ein Analysenfehler zu nennen. Die ^{13}C -Anreicherung im Endosperm der Mutanten zeigte keine Abweichungen zwischen den Versuchsjahren. Ein Einfluss des Faktors Genotyp wurde weder 2009 noch 2010 festgestellt.

Da für die Endosperme keine Gesamt-Kohlenstoffmengen bestimmt werden konnten, sind gesicherte Aussagen zur ^{13}C -Menge (Überschuss in $[\mu\text{g}]$) nicht möglich. Um diese abzuschätzen, wurden sie wie in Tab. 19 dargestellt, über die Trockenmasse der Endosperme und einen mit 45 % TM geschätzten C-Massenanteil näherungsweise berechnet. Betrachtet man den ^{13}C -Überschuss (μg) in den Endospermen, so erkennt man, dass die Unterschiede zwischen den Genotypen zu 8 und 14 dpa gering waren und es zwischen diesen Probe-

nahmeterminen in allen Fällen zu einem starken Anstieg um das 9,1- bis 12,5-fache kam. Dies bestätigt die zuvor in Anlehnung an die Literatur gemachten Aussagen. Die höchsten Überschusswerte zu 20 dpa stützen die Annahme, dass im untersuchten Zeitraum das Maximum der Stärkesynthese zwischen 16 bis 20 dpa auftrat. Es ist jedoch ebenfalls zu erkennen, dass der Wert von 'Bomi' zu 20 dpa tendenziell höher lag als jener der Mutanten. Dies spricht dafür, dass die Stärkesyntheserate von 'Bomi' jene der Mutanten im Maximum übersteigt, d. h. die *Sink*-Stärke des Endosperms für Kohlenstoff höher ist. Es ist zu vermuten, dass Risø 16 und Risø 13 zu 14 dpa noch in der Lage waren, die Mutationen in der Stärkesynthese in hohem Maße zu kompensieren. Ein möglicher Mechanismus ist in beiden Fällen eine erhöhte Aktivität der plastidären AGPase, welche mit einem verstärkten Import von Glucose-1-Phosphat und/oder Glucose-6-Phosphat sowie ATP in die Amyloplasten einhergehen würde [40]. Weiterhin ist es möglich, dass es im Endosperm der Mutanten zu einer, gegenüber dem Wildtyp stärkeren Anreicherung niedermolekularer Zucker kam, welche sich anhand der bestimmten Parameter nicht von Stärke unterscheiden lassen. In Tab. 19 ist weiterhin die Summe des ^{13}C -Überschusses (μg) aller analysierten Organe aufgeführt. Besonders bei dem Vergleich der Termine 8 und 14 dpa (2009) fällt auf, dass dieser Wert zu 8 dpa um etwa 50 % geringer ausfällt. Der relativ konstante Überschuss in den Blättern und Sprossachsen lässt vermuten, dass sich die Pflanzen zu diesen Terminen hinsichtlich der insgesamt aufgenommenen ^{13}C -Mengen nicht unterscheiden. Daher ist anzunehmen, dass in dem frühen Stadium, in welchem die *Sink*-Stärke des Endosperms für Kohlenstoff noch gering ist, ein beträchtlicher Teil des ^{13}C bzw. des 4 Tage vor Probenahme assimilierten Kohlenstoffs in alternative Senken wie die Wurzel oder die Bestockungstriebe exportiert wurde. Alternativ ist es möglich, dass der Import von ^{13}C aus diesen Organen in den Haupttrieb von 8 dpa zu 20 dpa zunahm. Ob der Haupttrieb auf Gesamtpflanzenebene ab Anthese eine zunehmende C-Senke darstellt oder im sehr frühen Stadium (bis ca. 8 dpa) noch als C-Quelle fungiert und erst später Kohlenstoff netto importiert, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen. Jedoch ist eine Verschiebung der Balance des Kohlenstoffflusses zwischen Haupt- und Bestockungstrieben im Zeitraum nach der Anthese sehr wahrscheinlich. Die prozentuale Verteilung des ^{13}C in den drei Organfraktionen lässt erkennen, dass bei

allen Genotypen zu 8 dpa in den Blättern die relativ stärkste Einlagerung stattfand, gefolgt von der Sprossachse und den Endospermen, in welchen maximal 10 % des ^{13}C nachgewiesen wurde. Zu 14 und 20 dpa stieg der Anteil im Endosperm und dies in besonderem Maße bei 'Bomi', wo Werte von 54 bzw. 56 % erreicht wurden. Dies bestätigt noch einmal, dass die *Sink*-Stärke des Endosperms von 'Bomi' im Vergleich zu den Mutanten höher ist. Verglichen mit den summierten ^{13}C -Überschusswerten fallen die Schwankungen in den vegetativen Organen zwischen den verschiedenen Terminen sowie den Genotypen relativ gering aus. Es ist daher zu vermuten, dass die Einlagerung des aktuell assimilierten Kohlenstoffs in den Blättern und der Sprossachse in geringem Ausmaß von der Situation in den Kohlenstoffsenken wie der Wurzel und dem Endosperm abhängig ist und den Einbau im Rahmen von *turnover*-Prozessen (Proteine, Lipide etc.) widerspiegelt.

Die Ergebnisse des Wiederholungsversuches hinsichtlich des ^{13}C -Überschusses (μg) sprechen bei kritischer Betrachtung nicht für eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die niedrigeren Werte der Mutanten lassen sich durch die allgemein schlechtere Performance der Pflanzen 2010 bzw. durch die geringeren Trockenmassen und Kohlenstoffmengen der Endosperme erklären. Im Fall von 'Bomi' kam es jedoch zu einer Verringerung der ^{13}C -Menge im Endosperm um das etwa 3,5-fache und auch der Massenanteil sank von ca. 340 (2009) auf $106 \mu\text{g } ^{13}\text{C} * \text{g}^{-1} \text{ TM}$ (2010). Bei wenig veränderten ^{13}C -Werten in den vegetativen Organen ist ein Fehler bei der Isotopenmarkierung unwahrscheinlich. Da die Trockenmasse nicht in diesem Ausmaß abfiel, ist es wahrscheinlich, dass es sich um einen Analysenfehler handelt. In diesem Zusammenhang sei angemerkt, dass durch Probenausfall der Stichprobenumfang nur vier betrug und die Werte zudem einer relativ starken Streuung unterliegen, wobei jedoch kein Wert in der graphischen Auswertung als Ausreißer angezeigt wurde.

Tab. 19: Kalkulation des ^{13}C -Überschusses im Endosperm (in μg) und der Anteile der Organe an der Summe des ^{13}C -Überschusses aller analysierten Organe für die Genotypen 'Bomi', Risø 16 sowie Risø 13 aus den Versuchen 2009 und 2010. (SPR...Sprossachse, BL...Blätter, ES...10 analysierte Endosperme des Haupttriebes; ¹...Messwerte, ²...2009 exklusive-, 2010 inklusive Fahnenblatt, ³...Kohlenstoffmenge mit 45 % TM berechnet, ⁴...Summe der ^{13}C -Überschusswerte für Sprossachse, Blätter und die 10 analysierten Endosperme)

Genotyp	Jahr	dpa	^{13}C -Überschuss [μg]				% von Σ^4		
			SPR ¹	BL ^{1,2}	ES ³	Σ^4	SPR	BL	ES
'Bomi'	2009	8	25	49	9	83	31	59	10
		14	37	36	86	158	23	22	54
		20	37	49	112	198	19	25	56
	2010	20	26	51	29	106	24	48	28
Risø 16	2009	8	24	51	6	81	30	63	7
		14	35	50	75	160	22	31	47
		20	33	51	60	145	23	35	42
	2010	20	31	51	47	129	24	39	36
Risø 13	2009	8	19	53	8	79	24	66	10
		14	40	43	73	156	26	27	47
		20	46	69	53	168	27	41	32
	2010	20	30	47	34	111	27	42	30

5.4 Gesamt-N

Vegetative Organe

Hinsichtlich der Stickstoffmengen in den vegetativen Organen des Haupttriebes konnte im ersten Hauptversuch kein Einfluss des Prüffaktors Genotyp nachgewiesen werden (Abb. 18). Bei der Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der N-Mengen in den einzelnen Organen zeigen sich jedoch zumindest tendenziell, die bereits zuvor beobachteten Unterschiede zwischen Risø 13 und den Genotypen 'Bomi' sowie Risø 16. Bei letzteren besteht ein Trend zu sinkenden Werten von 8 dpa zu 20 dpa sowohl in den Blättern, als auch der

Sprossachse. Im Fall der Sprossachse von 'Bomi' und den Blättern von Risø 16 ist der Unterschied statistisch gesichert. Für Risø 13 bestand hingegen analog zur Trockenmasse und der C-Menge eine Tendenz zu steigenden N-Mengen in der Sprossachse und relativ konstanten Werten in den Blättern. Dies bestätigt erneut die Vermutung, dass das Wachstum der Sprossachse von Risø 13 im ersten Hauptversuch gegenüber dem Wildtyp und Risø 16 länger anhielt. Im Zeitraum von 8 - 20 dpa nahm die N-Menge in vegetativen Organen im Mittel um 5,5 und 7,7 mg bei 'Bomi' bzw. Risø 16 ab. Diese Abnahme steht sehr wahrscheinlich in Zusammenhang mit der Remobilisierung und anschließenden Verlagerung von Stickstoffverbindungen ins Korn. Bei Risø 13 wurden im Mittel 5,5 mg Stickstoff in die Blätter und Sprossachse eingelagert. Inwiefern gleichzeitig eine Remobilisierung von Stickstoff erfolgte lässt sich anhand dieses Parameters nicht feststellen.

Die N-Massenanteile in den vegetativen Organen [in % TM] sichern die zuvor gemachten Aussagen. Im Fall von 'Bomi' und Risø 16 folgen diese der N-Menge, was im Einklang mit der Konstanz der C-Mengen im Untersuchungszeitraum steht. Bei Risø 13 blieb der Anteil zwischen 8 und 20 dpa hingegen konstant. Dies bedeutet, dass die N- und C-Menge in der Sprossachse direkt proportional anstieg, während sich die Werte in den Blättern für beide Parameter nicht änderten.

Die N-Mengen in den Sprossachsen zu 20 dpa fielen 2010 gegenüber dem Vorjahr geringer aus, obgleich im Fall von 'Bomi' nur tendenziell (Abb. 19). Dies erklärt sich z. T. durch die ebenfalls verringerte Trockenmasse, jedoch bestand auch ein Trend zu einem reduzierten N-Massenanteil in diesem Organ (Abb. 21). Im Fall von Risø 13 wurde ein drastischer Rückgang um mehr als 50 % festgestellt. Dies bedeutet, dass in Relation zur Trockenmasse weniger Stickstoff in den Haupttrieb aufgenommen oder mehr N mobilisiert und eingelagert wurde. Eine mögliche Erklärung ist, dass den Pflanzen 2010 beispielsweise aufgrund höherer Ammoniakverluste weniger Stickstoff zu Verfügung stand. Da keine Untersuchung des Substrates erfolgte, lässt sich nicht sagen, inwieweit dieser Faktor limitierend wirkte. Weiterhin ist es möglich, dass 2010 weniger Stickstoff für den Haupttrieb zur Verfügung stand, da die Bestockung der Pflanzen etwas stärker ausfiel und sich so, trotz gleicher Stickstoffverfüg-

barkeit die Verteilung in der Gesamtpflanze änderte. Auch das Vermögen der Wurzel zur Stickstoffaufnahme, welche ebenfalls nicht untersucht wurde, könnte von Bedeutung sein. Die Ergebnisse des ersten Versuchsjahres wurden insofern bestätigt, als in beiden Versuchen zu 20 dpa kein Unterschied zwischen den Genotypen hinsichtlich der N-Menge sowie des N-Massenanteils festgestellt wurde. Die Betrachtung dieser Parameter für die Blattfraktion lässt, obwohl nicht direkt vergleichbar, vermuten, dass die zur Sprossachse gemachten Aussagen auch für diese zutreffen (Tab. 6).

Endosperm

Die N-Mengen in den Endospermen des ersten Hauptversuches zeigen bei den drei Genotypen einen sehr ähnlichen zeitlichen Verlauf (Abb. 32). Es wurde ein deutlicher Anstieg von 8 über 14 zu 20 dpa beobachtet. Wobei die Zuwachsfaktoren im ersten Intervall mit 4,0 höher ausfielen, als zwischen 14 und 20 dpa mit 1,7 (Mittel aller Genotypen).

Die Bildung der Proteinfractionen Albumine, Globuline und Gluteline beginnt bei der Gerstensorte 'Sundance' ab etwa 10 dpa bzw. dem Erreichen von 15 % der finalen Karyopsen-TM [37]. In der vorliegenden Arbeit lag die Trockenmasse der Endosperme bei allen Genotypen zu 8 dpa zwischen ca. 5 - 8 % des finalen Wertes. Dies ist jedoch ein Näherungswert, welcher aus der Trockenmasse ganzer Karyopsen zur Reife inklusive Vorspelze, Deckspelze und Embryo (Tab. 10) sowie jener präparierter Endosperme vom Probenahmetermin 8 dpa (Abb. 27) berechnet wurde. Der exakte Wert liegt somit etwas höher. Der Rohproteingehalt im Endosperm betrug zu 8 dpa 6 - 10 % des Wertes zur Reife. Damit ist zu vermuten, dass die Bildung der Proteinfractionen bei 'Bomi' und den Mutanten vor 10 dpa einsetzt. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass die N-Menge auch nicht-proteinogenen Stickstoff (NPN) und jenen aus amphiphilen Proteinen einschließt und dass deren Anteil am Gesamt-N im Laufe der Kornentwicklung durch die verstärkte Einlagerung von Speicherproteinen sinkt. Die in diesem frühen Stadium der Endospermentwicklung gebildeten Proteine besitzen vor allem Struktur- und metabolische Funktionen und sind damit hauptsächlich der Albumin/Globulin-Fraktion zuzuordnen [37, 60].

Zu 14 Tagen nach Anthese wurden bei allen Genotypen Rohproteingehalte von 27 - 34 % des finalen Wertes erreicht. Der starke Anstieg im Vergleich zum vorherigen Probenahmetermin erklärt sich durch die Synthese von Albuminen, Globulinen, Glutelinen und auch Hordeinen. Nach RAHMANN et al. (1982) setzt die Bildung letztgenannter Fraktion bei der Sorte 'Sundance' ab ca. 18 dpa ein [37]. Die Untersuchungen der Proteinzusammensetzung (siehe Kap. 5.6) zeigt, dass dies bei 'Bomi' und den Mutanten zu einem früheren Zeitpunkt beginnt. Es ist anzumerken, dass 'Tage nach Anthese' (dpa) kein optimales Maß für den Vergleich der Entwicklungsstadien von Endospermen aus Studien verschiedener Autoren ist, da es im Gegensatz zur Thermalzeit (TT) nicht die Temperaturabhängigkeit der Entwicklung berücksichtigt.

Zum Zeitpunkt 20 dpa wurde 2009 im Gegensatz zu 8 und 14 dpa ein Einfluss des Prüffaktors Genotyp bezüglich der N-Menge in den Endospermen festgestellt. Der Wert von 'Bomi' fiel dabei im Vergleich zu den Mutanten höher aus (+ 0,026 mg N pro Endosperm bzw. + 0,178 mg RP). Da der Unterschied jedoch im Wiederholungsversuch 2010 nicht auftrat, ist er als temporärer Effekt anzusehen. Das Ergebnis aus dem ersten Hauptversuch steht im Einklang mit den Werten der Endosperm-trockenmassen (Abb. 27), welche die gleiche Dynamik zeigten. Der Rohproteingehalt betrug zu 20 dpa 56 %, 41 % und 65 % des finalen Wertes (aus Tab. 10) bei 'Bomi', Risø 16 bzw. Risø 13, wobei die Endosperm-trockenmassen in gleicher Reihenfolge ca. 56 %, 45 % sowie 73 % des Wertes zur Reife erreicht hatten. Da dies stark auf einen linearen Anstieg der Stickstoffmenge zur Trockenmasse des Endosperms hindeutet, wurde die lineare Regression berechnet (Abb. 49). Diese ergab, dass die Stickstoffmenge im Endosperm in hohem Maße ($R = 0,990$) mit der Trockenmasse korreliert. Der Zusammenhang lässt sich über das Modell $y = 22,7 * x + 36,5$ ($R^2 = 0,980$) beschreiben. Berechnet man mittels dieser Gleichung die Werte zur Reife, erhält man nach Umrechnung mit dem Faktor 6,8 für 'Bomi', Risø 16 bzw. Risø 13 einen Schätzwert für den Rohproteingehalt von 15,9, 15,9 und 16,2 % TM. Im Fall von 'Bomi' liegt der Schätzwert sehr nah am tatsächlich bestimmten Wert von 16,37 % TM (vgl. Tab. 10), was zeigt, dass das Modell in diesem Fall auch für das Intervall von 20 dpa bis zur Reife gilt. Für die Mutanten hingegen ist das Modell schlechter geeignet, Vorhersagen bis zur Reife zu treffen. Hierbei ist anzumerken, dass sich diese Aus-

sage auch nicht ändert, wenn die Regression für jeden Genotyp einzeln durchgeführt wird, da die Funktionen kaum voneinander abweichen (nicht dargestellt). Da Kohlenstoff den größten Massenanteil an der Trockenmasse hat ist anzunehmen, dass die Stickstoffmenge ebenfalls linear mit der Kohlenhydratmenge im Endosperm korreliert. Man erkennt, dass der Zusammenhang darin besteht, dass die Kohlenhydratakkumulation von der des Proteins abhängt. Dies ergibt sich aus der Beobachtung, dass das Rohprotein bei den Mutanten gegenüber dem Wildtyp zur Reife einen höheren Anteil an der Trockenmasse hat, während der Anteil der stickstofffreien Extraktstoffe (Kohlenhydrate) im Vergleich zu 'Bomi' geringer ausfällt (siehe Tab. 10). Wäre die Akkumulation von Rohprotein von der Kohlenhydrateinlagerung abhängig, käme es nicht zu einer Steigerung des Rohproteingehaltes bei Risø 16 und Risø 13, welche durch die bereits erwähnten Mutationen weniger Stärke im Endosperm gegenüber dem Wildtyp aufweisen. Die zuvor aufgestellte Vermutung steht jedoch im Widerspruch zu Literaturberichten, wonach die Kohlenstoff- und Stickstoffeinlagerung im Endosperm weitestgehend unabhängig voneinander erfolgen [49, 131, 132, 133, 126, 62]. Überträgt man diese These auf die vorliegenden Ergebnisse, haben Proteine und Kohlenhydrate im Endosperm eine sehr ähnliche Akkumulationsdynamik, doch es besteht keine Interaktion beider Vorgänge.

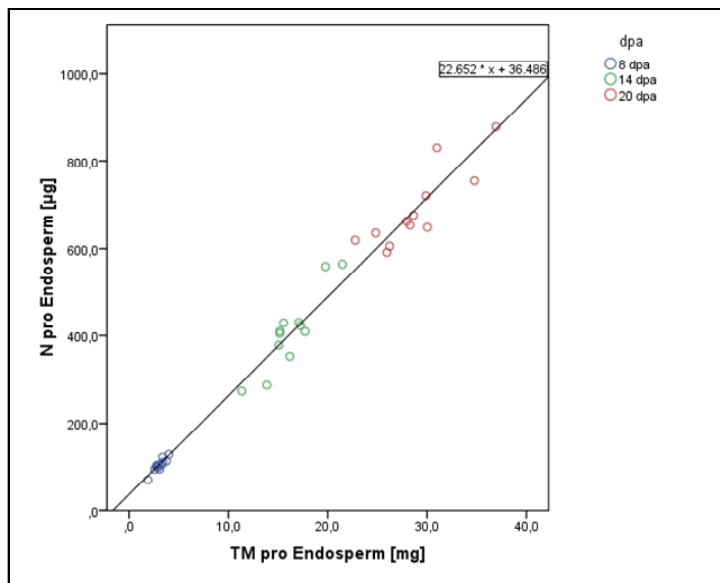


Abb. 49: Regressionsmodell für die Abhängigkeit der Stickstoffmenge [µg] im Endosperm von der Trockenmasse [mg], erstellt anhand der Daten von den Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 aus dem ersten Hauptversuch (2009). ($R = 0,990$, $R^2 = 0,980$)

Die Betrachtung der zeitlichen Verläufe der N-Mengen in den vegetativen Organen sowie den Endospermen legt die Frage nahe, ob bei 'Bomi' und Risø 16 eine proportionale Beziehung hinsichtlich der Abnahme bei ersteren und der Zunahme bei letzteren besteht. Ein möglicher Zusammenhang besteht darin, dass die N-Menge in den vegetativen Organen infolge von Remobilisierung und Verlagerung stickstoffhaltiger Verbindungen ins Korn sinkt. Hierzu wurde zunächst überprüft, inwiefern diese beiden Größen korrelieren (Tab. 20). Es ist zu sehen, dass für die Sprossachse von 'Bomi' sowie für die Blätter und die Summe der vegetativen Organe von Risø 16 eine schwache negative Korrelation mit der N-Menge im Endosperm vorliegt. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) beträgt in allen Fällen mit signifikanter Korrelation 0,46 – 0,47, was bedeutet, dass das nur knapp die Hälfte der Varianz der N-Menge im Endosperm durch das Modell erklärt wird.

Tab. 20: Korrelationskoeffizienten nach PEARSON (R) für die Korrelation der N-Mengen im Endosperm mit jenen in den Sprossachsen, Blättern bzw. vegetativen Organen (Summe Sprossachse & Blätter) der Genotypen 'Bomi' sowie Risø 16 aus dem ersten Hauptversuch (8, 14 und 20 dpa). (* Korrelation ist auf dem Niveau 0,05 zweiseitig signifikant)

Genotyp	Sprossachse	Blätter	vegetative Organe
'Bomi'	- 0,685 *	- 0,304	- 0,449
Risø 16	- 0,491	- 0,683 *	- 0,675 *

In Tab. 21 sind die mittleren Differenzen der N-Mengen zwischen den drei Probenahmeterminen in den vegetativen Organen (Blätter und Sprossachse) sowie den Endospermen dargestellt. Dabei ist zu beachten, dass die Werte für letztere über die vorhandenen Messwerte der 10 mittleren Endosperme einer Ähre und die Gesamtanzahl pro Ähre berechnet wurden und somit Näherungswerte darstellen. Für 'Bomi' und Risø 16 ist der im Zeitintervall von 8 bis 20 dpa aus den vegetativen Organen ausgelagerte Stickstoff ausreichend, um 47 % bzw. 99 % des Bedarfs für die Endospermfüllung zu decken. Die Werte der Mutante Risø 13 bedeuten, dass die Pflanzen theoretisch in der Lage sind, den N-Bedarf der Endosperme bis 20 dpa ohne einen Beitrag remobilisierten Stickstoffs aus den vegetativen Organen des Haupttriebes zu decken. Bei diesen Betrachtungen ist jedoch zu beachten, dass ein Rückgang der N-Menge in den vegetativen Organen nicht mit der Verlagerung dieses Stickstoffs ins Endosperm gleichgesetzt werden kann, da das Ausmaß möglicher Verluste an die Umwelt und die Verlagerung in andere Organe nicht bekannt sind. In diesem Zusammenhang ist auf eine Arbeit mit Weizen zu verweisen, in welcher 6 - 19 % des vor Anthese in den vegetativen Organen akkumulierten N bis zur Reife an die Umwelt verloren gingen [130]. Im Fall von Risø 13 ist es möglich, dass ebenfalls bedeutende N-Mengen in den vegetativen Organen remobilisiert wurden, jedoch parallel eine N-Einlagerung in stärkerem Ausmaß stattfand. Dies wird durch Literaturberichte für Gerste [68], Weizen [87] und Mais [88] gestützt, wonach der Anteil des nach Anthese aufgenommenen Stickstoffs am GPC unter 50 % liegt. In einer Studie mit Sommergerste fiel dieser Anteil bei optimaler Stickstoffversorgung mit 31 % zu 21 dpa sogar noch geringer aus. Die Einlagerung des nach Anthese aufgenommenen

Stickstoffs in den Sprossachsen und Blättern betrug darin zu 21 dpa 24,7 % bzw. 15,2 % (vom Gesamt-N im Organ) [68].

Die vorherigen Ausführungen zeigen, dass zumindest bei 'Bomi' und Risø 16 eine Remobilisierung bedeutender N-Mengen in den vegetativen Organen erfolgte und in Anlehnung an zuvor genannte Literaturstellen [68, 87, 88, 130] ergibt sich, dass ein großer Teil dieses Stickstoffs in das Endosperm verlagert wurde. Es ist keine Aussage möglich, welchen genauen Beitrag Remobilisierung und aktuelle Assimilation zur Stickstoffakkumulation im Endosperm des Haupttriebes im Untersuchungszeitraum liefern. Dies ist bedingt durch die Tatsache, dass erstens parallel zur N-Auslagerung in den vegetativen Organen eine Einlagerung von aktuell assimiliertem N erfolgt ([68] und Abb. 22), zweitens keine Aussage getroffen werden kann, wie effizient der mobilisierte Stickstoff ins Korn verlagert wird oder an die Umwelt verloren geht (Ammoniakverluste) und drittens der Beitrag der Bestockungstriebe und Wurzeln nicht abzuschätzen ist. Das breite Spektrum der Werte vom negativen bis in den positiven Bereich (Tab. 21) lässt vermuten, dass die zuvor genannten Prozesse sehr komplex sind und dynamisch interagieren. Tiefergehende Betrachtungen zur Interaktion von Haupt- und Bestockungstrieben finden sich in Kapitel 5.9.

Tab. 21: Mittlere Änderung der N-Menge in den vegetativen Organen (Blätter und Sprossachse) sowie in den Endospermen einer Ähre innerhalb der Zeiträume 8 - 14 dpa, 14 - 20 dpa und 8 - 20 dpa (2009). Die Werte für die Endosperme wurden aus der N-Menge der analysierten 10 mittleren Endosperme und der Anzahl an Karyopsen pro Ähre kalkuliert.

Genotyp	Zeitraum [dpa]	Differenz N-Menge [mg]	
		Vegetative Organe	Endosperme (alle pro Ähre)
'Bomi'	8 - 14	- 1,0	5,8
	14 - 20	- 4,5	6,0
	8 - 20	- 5,5	11,8
Risø 16	8 - 14	- 6,6	4,9
	14 - 20	- 1,2	3,0
	8 - 20	- 7,7	7,9
Risø 13	8 - 14	2, 0	3,4
	14 - 20	3,5	5,7
	8 - 20	5,5	9,1

Im Zusammenhang mit den N-Mengen, sind auch die N-Anteile an der Trockenmasse des Endosperms (Abb. 33) zu berücksichtigen. Diese zeigen, dass zu keinem Probenahmetermin ein Unterschied zwischen den Genotypen bestand. Weiterhin wird deutlich, dass sowohl beim Wildtyp, als auch bei den Mutanten der Massenanteil zu 8 dpa gegenüber 14 dpa deutlich höher lag und anschließend konstant blieb. Dies bedeutet, dass im Zeitraum vor 8 dpa gegenüber 14 dpa mehr Stickstoff in Relation zu Kohlenhydraten eingelagert wurde. Dies steht in Übereinstimmung mit Literaturangaben, wonach zwischen 5 und 9 dpa die Stärkesynthese und damit eine verstärkte Einlagerung von Kohlenstoff einsetzt [47, 48]. Im Zeitraum von 14 dpa zu 20 dpa nahm die Einlagerung von Speicherproteinen und Kohlenhydraten in gleichem Maße zu.

Im zweiten Hauptversuch 2010 wurde sowohl hinsichtlich der N-Menge, als auch des N-Massenanteils kein Einfluss des Prüffaktors Genotyp zu 20 dpa festgestellt (Tab. 8). Wie bereits zuvor erwähnt bedeutet dies, dass die erhöh-

te N-Menge bei 'Bomi' gegenüber den Mutanten im ersten Hauptversuch (20 dpa) sehr wahrscheinlich einen temporären Effekt darstellt. Ein statistisch gesicherter Unterschied zwischen den Versuchsjahren wurde weder für die N-Menge, noch für den Massenanteil festgestellt, was belegt, dass die Ergebnisse gut reproduzierbar sind. Hinsichtlich des Stickstoffanteils an der Trockenmasse [%] bestand jedoch bei allen drei Genotypen ein Trend zu höheren Werten 2010. In Kombination mit den gleichbleibenden Stickstoffmengen [mg] und den, zumindest tendenziell geringeren Endosperm Trockenmassen (Abb. 29), im Wiederholungsversuch bedeutet dies, dass 2010 weniger Kohlenstoff im Endosperm akkumuliert wurde. Diese Beobachtung stützt die in anderen Arbeiten aufgestellte These, dass die Kohlenstoff- und Stickstoffeinlagerungen im Endosperm weitestgehend unabhängig voneinander erfolgen [49, 131, 132, 133, 126, 62].

5.5 ^{15}N – Vier Tage vor Probenahme assimilierter Stickstoff

Vegetative Organe

Der ^{15}N -Überschuss in den vegetativen Organen des Haupttriebes aus dem ersten Hauptversuch (Abb. 22) unterschied sich, mit einer Ausnahme, nicht zwischen den drei Genotypen. Nur im Fall der Sprossachse von Risø 13 lag der Wert zu 20 dpa deutlich höher als jener von 'Bomi' und Risø 16. Bezüglich des zeitlichen Verlaufes bestanden Tendenzen, auf welche im Folgenden eingegangen werden soll.

Im Fall von 'Bomi' bestand der Trend zu einem sinkendem ^{15}N -Überschuss in der Sprossachse von 8 über 14 zu 20 dpa (Abb. 22). Dies spiegelt den Verlauf der N-Menge in diesem Organ wider (Abb. 18). Korrespondierend zu diesen Werten betrug die ^{15}N -Anreicherung 0,523 Atom-% zu 8 dpa, 0,571 Atom-% zu 14 dpa und 0,658 Atom-% zu 20 dpa. Die Schlussfolgerung daraus ist, dass die Auslagerung von unmarkiertem Stickstoff (Remobilisierung) aus der Sprossachse von 'Bomi' stärker zunahm, als die Einlagerung von aktuell aufgenommenem, d. h. ^{15}N -angereichertem Stickstoff abnahm. Somit stieg das ^{15}N - zu Gesamt-N-Verhältnis doch der ^{15}N -Überschuss [μg] sank entsprechend der Gesamt-N-Menge (siehe Gl. 3.11). Bei der Sprossachse von Risø 16 änderten sich N-Menge, ^{15}N -Überschuss und ^{15}N -Anreicherung zwischen 14 und

20 dpa nicht, so dass von einer unveränderten Einlagerung des 4 Tage vor Probenahme aufgenommenen Stickstoffs auszugehen ist. Jedoch nahm bei dieser Mutante die N-Menge in der Tendenz von 8 zu 14 dpa um 27 % ab und der ^{15}N -Überschuss [μg] um 23 % zu. Auch die Anreicherung stieg zwischen 8 dpa und 14 dpa von 0,464 Atom-% auf 0,785 Atom-% (+ 69%). Dementsprechend war die Einlagerung von aktuell assimiliertem Stickstoff zu 14 dpa gegenüber 8 dpa höher auch wenn die Gesamt-N-Menge in diesem Zeitraum abnahm. Wie bei den zuvor diskutierten Parametern, wich Risø 13 2009 hinsichtlich der Entwicklungsdynamik der Sprossachse des Haupttriebes von den anderen Genotypen ab. Die N-Menge und der ^{15}N -Überschuss stiegen von 8 über 14 zu 20 dpa an, wobei der Unterschied zwischen 8 dpa und 20 dpa signifikant ausfiel (+ 30 μg). Die ^{15}N -Anreicherung betrug 8 dpa 0,53 Atom-%, zu 14 dpa 0,677 Atom-% und 20 dpa 0,661 Atom-%. Dies bedeutet, in den drei Markierungszeiträumen wurde jeweils mehr ^{15}N in der Sprossachse eingelagert. Die Werte der ^{15}N -Anreicherung zeigen jedoch, dass 14 dpa gegenüber 8 dpa mehr ^{15}N in Relation zu unmarkiertem Stickstoff akkumuliert wurde. Zwischen 14 und 20 dpa blieb das Verhältnis hingegen konstant. Hinsichtlich der zuvor gemachten Aussagen zu den Vorgängen in der Sprossachse ist anzumerken, dass der Nachweis einer bestimmten Menge ^{15}N nicht mit der Einlagerung in dieses Organ gleichgesetzt werden kann. Es bleibt offen, in welchem Ausmaß es zu einem Einbau in organische Substanz mit Struktur oder metabolischer Funktion kam und wie hoch der Anteil des ^{15}N ist, welcher sich im Prozess der Verlagerung ins Korn befand.

In den Blättern der drei Genotypen bestand im ersten Hauptversuch ein Trend zu sinkendem ^{15}N -Überschuss (Abb. 22). Nur im Fall von Risø 13 nahm er zwischen 8 und 14 dpa tendenziell etwas zu. Die N-Menge in den Blättern von 'Bomi' und Risø 16 nahm zwischen 8 und 20 dpa zumindest in der Tendenz ebenfalls ab, jene von Risø 13 stieg leicht an. Dies bedeutet, dass zwischen 8 und 20 dpa die Einlagerung des im Markierungszeitraum assimilierten Stickstoffs in diese Organfraktion rückläufig war, wobei dieser Prozess bei Risø 13 verzögert einsetzte. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Blätter, vor allem im unteren Bereich des Haupttriebes nach der Anthese zunehmend seneszent wurden (visuelle Beobachtung), wodurch die *Sink*-Stärke dieser Organfraktion

abnahm. Insgesamt bedeutet dies, dass der Transport des aktuell assimilierten Stickstoffs von der Wurzel ins Korn von 8 zu 20 dpa zunehmend gerichteter erfolgte (vgl. Abb. 34, Tab. 22).

Hinsichtlich der ^{15}N -Massenanteile in den vegetativen Organen konnten 2009 ebenfalls zu keinem Termin genotypische Unterschiede festgestellt werden (Abb. 24). Die zeitlichen Verläufe dieses Parameters entsprechen in der Tendenz jenen des ^{15}N -Überschusses. In den Blattfraktionen aller drei Genotypen wurde eine Abnahme des ^{15}N -Massenanteils an der Trockenmasse beobachtet, wobei der Unterschied im Fall von Risø 13 zwischen 8 dpa und 20 dpa signifikant ausfiel. In Kombination mit den konstanten C-Mengen bestätigt dies die rückläufige Einlagerung des vier Tage vor Probenahme aufgenommenen Stickstoffs in die Blätter. Bei den Sprossachsen zeigten sich ebenfalls die zuvor beschriebenen Unterschiede. Der Massenanteil des ^{15}N nahm bei 'Bomi' von 8 dpa über 14 dpa zu 20 dpa ab, blieb bei Risø 16 relativ konstant und stieg im Fall von Risø 13 im gleichen Zeitintervall an.

Im Wiederholungsversuch 2010 wurden die Ergebnisse des Vorjahres weitestgehend bestätigt. Weder bei Sprossachsen noch Blättern bestand ein Einfluss des Prüffaktors Genotyp auf den ^{15}N -Überschuss sowie den ^{15}N -Massenanteil (Abb. 23, Abb. 25, Tab. 7). Der 2009 festgestellte Unterschied hinsichtlich des ^{15}N -Überschusses in der Sprossachse von Risø 13 gegenüber den anderen Genotypen trat wie auch bei den zuvor diskutierten Parametern 2010 nicht auf. Der Vergleich des ^{15}N -Massenanteils in der Sprossachse zu 20 dpa im ersten und zweiten Hauptversuch zeigt, dass dieser bei 'Bomi' 2010 signifikant höher ausfiel (Abb. 25). Dies erklärt sich durch die tendenziell geringere Trockenmasse im Wiederholungsversuch sowie die unveränderte Einlagerung von im Markierungszeitraum (16 - 20 dpa) assimiliertem Stickstoff. Ein Einfluss des Prüffaktors Versuchsjahr wurde bei den Blättern nicht festgestellt.

Endosperme

Die Einlagerung des vier Tage vor Probenahme assimilierten Stickstoffs in die Endosperme des Haupttriebes erfolgte bei allen drei untersuchten Genotypen nach dem gleichen Muster. Gemittelt für alle Genotypen betrug der ^{15}N -Überschuss zu 8 dpa 3,2 μg pro Endosperm, während zu 14 dpa mit 11,3 μg

wesentlich mehr ^{15}N eingelagert wurde, ebenso wie zu 20 dpa (12,2 μg). Ein signifikanter Einfluss des Prüffaktors Genotyp bestand nur zum Zeitpunkt 8 dpa, wobei 'Bomi' einen höheren Wert als die Mutante Risø 16 aufwies (+ 1,1 μg). Wie im vorherigen Abschnitt bereits erläutert, befindet sich die Bildung der Proteine des Endosperms im Zeitraum 4 bis 8 dpa noch in der initialen Phase und die *Sink*-Stärke für Stickstoff ist somit gering. In den Zeiträumen 10 bis 14 dpa sowie 16 bis 20 dpa kommt es hingegen, vor allem bedingt durch die Bildung von Speicherproteinen, zu einer massiven Einlagerung von Stickstoff. Während sich der ^{15}N -Überschuss im Endosperm zwischen 14 und 20 dpa kaum änderte, stieg die Gesamt-Stickstoffmenge in diesem Zeitraum weiter deutlich an (siehe Abb. 32). Dies ist ein Hinweis darauf, dass zu 20 dpa mehr remobilisierter Stickstoff eingelagert wurde, wodurch es zu einem Verdünnungseffekt kam. Da diese Annahme nicht eindeutig durch die N-Mengen in den Blättern und Sprossachsen des Haupttriebes belegt werden kann, besteht Grund zur Annahme, dass der N-Remobilisierung in den nicht untersuchten Pflanzenorganen (Wurzelgewebe und Bestockungstriebe) eine bedeutende Rolle zukommt. In Tab. 22 sind die ^{15}N -Überschüsse in den Endospermen, den analysierten vegetativen Organen sowie die Summe beider Größen aufgeführt. Anhand der summierten Werte erkennt man, dass bei allen Genotypen von 4 bis 8 dpa gegenüber den anderen Markierungszeiträumen weniger ^{15}N in die oberirdischen Organe des Haupttriebes eingelagert wurde. Die Unterschiede zwischen 14 und 20 dpa fallen hingegen gering aus. Weiterhin ist zu sehen, dass der Anteil des aktuell assimilierten Stickstoffs, welcher ins Endosperm verlagert wurde, von 8 dpa (23 - 40 %) über 14 dpa (61 - 70 %) zu 20 dpa (73 - 79 %) anstieg. Dies bedeutet, dass mit zunehmender *Sink*-Stärke der Endosperme für Stickstoff die aktuelle N-Assimilation und -Verlagerung in die oberirdischen Organe anstieg oder mehr ^{15}N aus den Bestockungstrieben in den Haupttrieb verlagert wurde. Gleichzeitig erfolgte der Transport ins Korn zunehmend gerichteter.

Bezüglich des N-Transports zum Korn und der Rolle der Blätter dabei existieren zwei Modelle [64]. Anhand einer Untersuchung an seneszenten Blättern von Reis wurde postuliert, dass die Umverlagerung des Stickstoffs vom Xylem in das Phloem in den Blättern überwiegend direkt erfolgt, während der Fluss

durch den Proteinpool geringer ausfällt [63]. Die Ergebnisse anderer Studien ließen jedoch darauf schließen, dass sich der gesamte über das Xylem angelieferte Stickstoff mit dem bereits vorhandenen N-Pool des Sprosses vermischt, bevor er in das Phloem umverlagert wird [65, 64]. Obwohl diese Frage mit den vorliegenden Daten nicht eindeutig zu klären ist, kann vermutet werden, dass bei der N-Umverlagerung vom Xylem in das Phloem in den Blättern der Fluss durch den Proteinpool in allen Markierungszeiträumen etwa gleich hoch war (nahezu gleiche ^{15}N -Überschusswerte/Abnahme durch Seneszenz). Um den gesteigerten ^{15}N -Fluss ins Endosperm von 8 zu 14 dpa zu erklären, kann zum einen angenommen werden, dass der direkte Fluss durch den löslichen N-Pool der Blätter zunahm. Andernfalls müsste die *turnover*-Rate des unlöslichen N-Pools (Proteine) angestiegen sein. Weiterhin ist es möglich, dass die Umverlagerung in gesteigertem Ausmaß in den Spelzen erfolgte, welche jedoch nicht analysiert wurden.

Tab. 22: Mittlerer ^{15}N -Überschuss [μg] in den vegetativen Organen (Blätter & Sprossachse) und Endospermen der Ähre des Haupttriebes aus dem ersten Hauptversuch 2009 sowie Anteile der Endosperme an der Summe der ^{15}N -Überschusswerte in den analysierten Organen. Die Werte für die Endosperme einer Ähre wurden über die Anzahl fertiler Karyopsen und den mittleren ^{15}N -Überschuss in den 10 analysierten mittleren Endospermen der Ähre kalkuliert.

Genotyp	dpa	Mittlerer ^{15}N -Überschuss [μg]			Anteil Endosperme an Summe [%]
		veg. Organe	Endosperme	Summe	
'Bomi'	8	98,3	64,2	162,5	39,5
	14	85,8	201,0	286,8	70,1
	20	60,9	228,8	289,4	79,1
Risø 16	8	113,2	33,5	146,7	22,8
	14	81,6	151,7	233,2	65,0
	20	68,6	184,8	253,4	72,9
Risø 13	8	92,7	55,8	148,5	37,6
	14	110,8	170,6	281,4	60,6
	20	54,2	177,9	232,1	76,7

Der ^{15}N -Massenanteil an der Trockenmasse der Endosperme aus dem ersten Hauptversuch nahm von 8 zu 20 dpa bei allen Genotypen deutlich ab, wobei die Werte zu 14 dpa tendenziell dazwischen lagen. Dieser Verlauf erklärt sich durch den Verdünnungseffekt, welcher infolge der verstärkten Einlagerung von unmarkiertem Stickstoff und Kohlenstoff im zeitlichen Verlauf zustande kommt.

Der Wiederholungsversuch 2010 bestätigte die Ergebnisse aus dem ersten Hauptversuch 2009. Es wurden in beiden Versuchen keine genotypischen Unterschiede hinsichtlich der ^{15}N -Überschusswerte und der ^{15}N -Massenanteile in den Endospermen zu 20 dpa festgestellt. Weiterhin hatte auch der Prüffaktor Versuchsjahr in keinem Fall einen signifikanten Einfluss auf diese Parameter. Dies belegt die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der ^{15}N -Pulsmarkierungsmethode.

5.6 Die Proteinfractionen des Endosperms

Gesamt-N

Wie unter Punkt 5.4 diskutiert, fanden sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den Genotypen bezüglich der N-Mengen in den vegetativen Organen. Somit ist davon auszugehen, dass die *N-Source*-Situation, was remobilisierbaren Stickstoff in den oberirdischen Organen betrifft, für Wildtyp und Mutanten sehr ähnlich war. Hinsichtlich der Gesamt-Stickstoffmengen in den Endospermen wies 'Bomi' zu 20 dpa in beiden Versuchsjahren, zumindest tendenziell, höhere N-Mengen gegenüber den Mutanten auf. Diese Tendenz wurde auch bei der Gegenüberstellung der Summen der N-Mengen in den extrahierten Proteinfractionen, sowohl zu 14, als auch zu 20 dpa festgestellt (Tab. 11). In der Literatur finden sich zahlreiche Berichte, dass der GPC hauptsächlich *Source*-limitiert, bzw. in der frühen Phase (bis 10 - 15 dpa) mit der Akkumulation von Proteinen mit struktureller und metabolischer Funktion *Sink*-limitiert und anschließend während der Bildung der Speicherproteine *Source*-limitiert ist [49, 81, 89, 90]. Dies bedeutet, dass die Mutanten tendenziell schlechter in der Lage waren, aktuell assimilierten Stickstoff ins Korn zu verlagern, die Mobilisierungseffizienz geringer war (= die Effizienz mobilisierten N ins Korn zu verlagern – z. B. durch höhere Verluste an die Umwelt), mehr

mobilisierter Stickstoff vom Haupttrieb in die Bestockungstriebe verlagert wurde oder der Beitrag der Bestockungstriebe zur Stickstoffversorgung der Körner des Haupttriebes geringer ausfiel. Auf letzteres wird in Kapitel 5.9 detaillierter eingegangen.

Albumine und Globuline

Auf der Ebene der Stickstoffeinlagerung in die einzelnen Proteinfractionen fanden sich stärkere Unterschiede zwischen den Genotypen (siehe 4.1.8.). Wie die N-Mengen in den Fraktionen pro Endosperm (Abb. 36) und die Massenanteile der Fraktionen an der Trockenmasse der Endosperme (Abb. 38) zeigen, wurden 2009 zu 14 dpa bei den Mutanten und besonders von Risø 16 im Vergleich zu 'Bomi' absolut, als auch in Relation zur Trockenmasse mehr Albumine und Globuline gebildet. Die Massenanteile der AG-Fraktion am extrahierten Gesamtprotein (Abb. 40) verdeutlichen, dass dies nicht durch einen höheren GPC bei den Mutanten bedingt ist, da auch diese bei den Mutanten tendenziell bzw. bei Risø 16 deutlich höher ausfielen. Die N-Menge in dieser Fraktion (N_{AG}) stieg im Fall von 'Bomi' und fiel bei Risø 16 zum nächsten Probenahmetermin (20 dpa), während für Risø 13 keine Veränderung festgestellt wurde. Zu 20 dpa wurden 2009 diesbezüglich weder für die N_{AG} -Menge noch den Massenanteil an der Trockenmasse und dem extrahierten Gesamtprotein genotypische Unterschiede registriert. Dahingegen lagen 2010 die N_{AG} -Mengen der Mutanten, welche sich ihrerseits nicht unterschieden, über jener von 'Bomi' (Abb. 37). Der Vergleich der Versuchsjahre für den Anteil dieser Fraktion am Gesamtprotein zeigt jedoch nur im Fall von Risø 13 einen signifikanten Unterschied (Abb. 40). Dieser ist hauptsächlich durch die stark verringerte N_{HOR} -Menge im Wiederholungsversuch bedingt (siehe Abb. 37), was mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einen Extraktionsfehler zurückzuführen ist. Es ist bekannt, dass die Proteine der AG-Fraktion hauptsächlich metabolische und strukturelle Funktionen innehaben, obgleich zumindest bei Weizen ein Teil der Globulinfraktion auch eine N-Speicherfunktion hat [60, 91]. Die erhöhten Mengen bzw. Anteile am Gesamtprotein dieser Fraktion bei den Mutanten gegenüber dem Wildtyp zeigen, dass die Mutanten einen höheren Bedarf an metabolischen Proteinen haben, um die beschriebenen Defekte in der Stärkesynthese zu kompensieren. Dies kann z. B. in Zusammenhang mit einer

verstärkten Exprimierung von alternativen Stoffwechselwegen für Kohlenstoff, z. B. in Zellwandbestandteile wie β -D-Glucan oder Lipide stehen. Hinweise hierfür finden sich in den erhöhten Massenanteilen der Rohfaser- und Rohfett-Fractionen an der Trockenmasse des reifen Korns, welche bei den Mutanten festgestellt wurden (siehe Tab. 10). Die von 14 zu 20 dpa (2009) zunehmende N_{AG} -Menge bei 'Bomi' reflektiert die in der Literatur beschriebenen Verhältnisse. Für Weizen und Gerste wurde berichtet, dass die N-Mengen bis ca. 20 dpa bzw. 35 dpa ansteigen und anschließend relativ konstant bleiben [91, 92, 37]. In einer Untersuchung von KIRKMAN et al. (1982) wurden in reifen Körnern von 'Bomi', je nach N-Düngung AG-Massenanteile von 1,54 – 2,29 $\text{mg } N_{AG} \cdot \text{g TM}^{-1}$ bestimmt [58]. In der vorliegenden Arbeit lagen die Massenanteile dieses Genotyps zu 20 dpa bei 1,4 $\text{mg } N_{AG} \cdot \text{g TM}^{-1}$ (2009) bzw. 1,8 $\text{mg } N_{AG} \cdot \text{g TM}^{-1}$ (2010). Da die Pflanzen ebenfalls sehr gut mit Stickstoff versorgt waren, bedeutet dies, dass die AG-Fraktion etwa zu 20 dpa den Massenanteil im reifen Korn erreichte. Die Abnahme der N_{AG} -Menge pro Endosperm von 14 zu 20 dpa bei Risø 16, welche auch bei Risø 13 als leichte Tendenz zu beobachten war, bedeutet, dass es zu einer Degradation von Protein in dieser Fraktion kam, sofern kein Extraktions- oder Analysenfehler vorliegt. Dieser Vorgang ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden. Der Vergleich der Versuchsjahre für die N_{AG} -Menge pro Endosperm zu 20 dpa zeigt, dass die Werte von 'Bomi' nahezu identisch waren, während bei beiden Mutanten 2010 signifikant höhere Mengen bestimmt wurden (Abb. 37). Eine mögliche Ursache hierfür sind die nicht völlig identischen Umweltbedingungen in beiden Versuchsjahren (siehe Tab. 2). Es wird als Tatsache angesehen, dass mehr als die Hälfte des GPC durch Umweltbedingungen bestimmt wird und nur zu einem geringen Anteil durch genetische Faktoren [93]. Auch das zeitliche Muster der Proteinakkumulation steht somit, wie nahezu alle Entwicklungsprozesse von Pflanzen, sehr wahrscheinlich unter dem Einfluss von Temperatur, Photoperiode und anderen Faktoren. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Vorgänge im Zusammenhang mit der Bildung der AG-Fraktion langsamer abliefen. Wenn es wie zuvor diskutiert zu einer stärkeren Anreicherung dieser Fraktion im Endosperm mit nachfolgender partieller Degradation kam, könnte dieser Prozess 2010 noch nicht abgeschlossen gewesen sein, wodurch die N_{AG} -Mengen im Vergleich zum Vorjahr höher ausfielen. Die in beiden Ver-

suchsjahren übereinstimmenden N_{AG} -Mengen von 'Bomi' stehen dazu nicht im Widerspruch, da die Bildung dieser Fraktion zu 20 dpa wie zuvor diskutiert (nahezu) abgeschlossen ist und dies 2009 auch schon vor 20 dpa der Fall gewesen sein kann. Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist, dass durch die gestörten Stärkesynthesewege der Mutanten die Vorgänge zur Bildung der Albumin/Globulin-Fraktion komplexer und dynamischer sind und sich daher schlechter reproduzieren lassen.

Hordeine

Die Hordeine oder Alkohol-löslichen Proteine stellen mit ca. 30 - 50 % am Gesamtprotein zur Reife die größte Proteinfraction im reifen Korn dar und sind bei Gerste der Haupt-Stickstoffspeicher [37, 58, 61]. Eine Studie von RAHMAN et al. (1982) kam zu dem Ergebnis, dass die Akkumulation von Hordein relativ spät in der Kornentwicklung (ca. 18 dpa, 4 % des Gehaltes zur Reife) einsetzt [37]. An anderer Stelle wurde berichtet, dass die HOR-Synthese bei Gerste (cv. 'Bomi') zwischen 10 und 15 dpa einsetzt und zur Reife eine Menge von ca. 700 μg pro Endosperm erreicht wird [58, 94]. In der vorliegenden Arbeit wurden zu 14 dpa 125, 51 und 58 μg N_{HOR} pro Endosperm von 'Bomi', Risø 16 bzw. Risø 13 bestimmt (Abb. 36). Die N_{HOR} -Mengen pro Endosperm stiegen zu 20 dpa in gleicher Reihenfolge auf 329, 200 und 210 μg an. Damit lag die N_{HOR} -Menge in Endospermen des Wildtyps zu 14 dpa tendenziell und zu 20 dpa signifikant über jener der Mutanten, welche sich ihrerseits nicht deutlich unterschieden. Die Werte der Mutanten zeigen, besonders zu 14 dpa, eine gute Übereinstimmung mit den in der Literatur für 'Bomi' berichteten [94], während jene von 'Bomi' deutlich höher liegen. Der starke Trend zu geringeren N_{HOR} -Mengen bei den Risø Mutanten gegenüber 'Bomi' zu 14 dpa steht im Einklang mit den im Vergleich zum Wildtyp höheren N_{AG} -Mengen. Nach KIRKMAN et al. (1982) fließt 'überschüssiger' Stickstoff, welcher nicht für metabolische Funktionen (AG) benötigt wird in die Speicherprotein-Fraktion [58]. Hinzu kommt die Tatsache, dass 'Bomi' im untersuchten Zeitraum wie bereits zuvor diskutiert (siehe 5.1) besser in der Lage war, Trockenmasse und damit auch Stickstoff einzulagern. Dies zeigt sich am gesamt-extrahierten Protein (Tab. 11) und den N-Mengen pro Endosperm (Abb. 32), was ebenfalls die geringeren N_{HOR} -Mengen bei den Mutanten zu 20 dpa erklärt. Die in Ab-

gleich mit den Literaturwerten [94] hohe N_{HOR} -Menge bei 'Bomi' reflektiert, gemeinsam mit dem im reifen Korn für eine Braugerste sehr hohen Rohproteingehalt (Tab. 10), die sehr gute Stickstoffversorgung, welche über den üblichen Feldanbaubedingungen lag. Die Abhängigkeit des GPC und damit der Hordeine als größter Proteinspeicherfraktion von der N-Zufuhr wurde bereits 1928 gezeigt und später mehrfach bestätigt [95, 58, 67].

Der Vergleich der Versuchsjahre 2009 und 2010 hinsichtlich der N_{HOR} -Menge zu 20 dpa zeigt, dass bei allen drei Genotypen die Tendenz zu niedrigeren Werten im Wiederholungsversuch bestand. Im Fall von Risø 16 war dies minimal, bei Risø 13 hingegen sank sie um mehr als 50 % ab. Für letztgenannten Fall liegt es nahe, einen Fehler bei der Extraktion zu vermuten. Bei 'Bomi' lag die Gesamt-N-Menge pro Endosperm 2010 um 80 µg niedriger als im Vorjahr (Tab. 8). Die Menge an N_{HOR} und N_{GLU} sank dabei um 67 µg bzw. 29 µg, während die des N_{AG} nahezu unverändert blieb (+ 1 µg). Wie bereits zuvor diskutiert, wirkte sich die zurückgegangene N-Zufuhr ins Endosperm vor allem auf die Speicherproteine aus. Für Risø 16 zeigte sich ein anderes Bild. Die Gesamt-N-Menge im Endosperm nahm im Mittel um 30 µg ab. Dabei stieg die N_{AG} -Menge um 22 µg, wohingegen die N_{HOR} - und N_{GLU} -Mengen um 9 µg bzw. 45 µg sanken. Dies verdeutlicht noch einmal die abweichende Dynamik der N-Einlagerung in die Proteinfractionen der Mutanten im Vergleich mit dem Wildtyp. Unter der Annahme, dass Gluteline zumindest teilweise eine Speicherfunktion haben ([55] und Autoren darin), bestätigen diese Daten, dass der N-Fluss in die metabolischen Proteine gegenüber den Speicherproteinen bevorzugt erfolgt und scheinbar weitgehend unabhängig von den *Source*-Verhältnissen ist.

Gluteline

Die Gluteline umfassen laut Literaturangaben hauptsächlich Proteine mit struktureller und metabolischer Funktion [96, 58, 37, 97]. Im Gegensatz dazu ist jedoch nach SHEWRY und TATHAM (1990) ein Großteil der Gluteline den Pro-laminen (HOR) strukturell sehr ähnlich und diesen zuzuordnen, was bedeuten würde, dass sie ebenfalls eine Speicherfunktion innehaben ([55] und Autoren darin). Von RAHMAN et al. (1982) wurde berichtet, dass in der Glutelinfraktion

Verunreinigungen durch Hordeine auftraten, wobei in dieser Arbeit die gleichen Extraktionspuffer für Hordeine und Gluteline wie in der vorliegenden genutzt wurden [37]. In zuvor genannter Quelle wird der Startzeitpunkt der Glutelinsynthese im Korn für die Sorte 'Sundance' mit ca. 10 dpa angegeben und es wurde im Anschluss ein stetiger Anstieg bis zur Reife festgestellt, der zu einem Anteil von 32 % des Gesamtproteins führte. Einer Abbildung dieser Publikation lässt sich entnehmen, dass bei Erreichen von 32 %, 56 % und 100 % der finalen Karyopsentrockenmasse (entspricht 14 dpa, 20 dpa bzw. Reife in der vorliegenden Arbeit) ca. 100 µg, 210 µg bzw. 450 µg N_{GLU} pro Endosperm enthalten waren. Für 'Bomi' wurden im reifen Korn je nach Kulturbedingungen 18,0 - 29,4 % von N_{Total} bzw. 118–330 µg N_{GLU} pro Korn bestimmt [58, 98].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kurz zusammenfassend ergab sich folgendes Bild (Abb. 36, Abb. 37): Im ersten Hauptversuch (2009) traten zu 14 dpa keine Unterschiede zwischen Genotypen auf und es wurden 88 - 90 µg N_{GLU} pro Endosperm bestimmt. Von 14 zu 20 dpa stieg die N_{GLU}-Menge im Endosperm bei 'Bomi' tendenziell (+ 23 µg), bei Risø 16 und Risø 13 deutlich an (+ 65 µg bzw. + 57 µg). Der Vergleich der Versuche in 2009 und 2010 zeigte nur im Fall von Risø 16 eine signifikante Veränderung (- 45 µg), doch auch der Wert der N_{GLU}-Menge bei 'Bomi' sank tendenziell etwas (- 29 µg). Somit lagen die N-Mengen in der Glutelinfraktion der Mutanten zu 20 dpa in beiden Versuchsjahren gegenüber dem Wildtyp höher, obgleich in zuvor genanntem Fall nur tendenziell. Zwischen Risø 16 und Risø 13 konnte diesbezüglich in keinem Fall ein Unterschied festgestellt werden. Das gleiche Bild ergibt sich bei der Betrachtung der Massenanteile der GLU-Fraktion an der Trockenmasse (Abb. 38, Abb. 39), jedoch kam es diesbezüglich in keinem Fall zu einer signifikanten Abweichung der Werte aus dem ersten und zweiten Hauptversuch.

Vergleicht man die Werte von 'Bomi' mit jenen, welche für die Sorte 'Sundance' berichtet wurden [37], zeigt sich zu 14 dpa nur ein geringer Unterschied, während die N_{GLU}-Menge pro Endosperm zu 20 dpa bei 'Bomi' deutlich geringer ausfällt. Sehr wahrscheinlich setzte somit auch bei 'Bomi' die GLU-Synthese etwa 10 dpa ein. Der Unterschied zu 20 dpa ist durch den

Sortenunterschied und abweichende Kornmassen sowie GPC`s zur Reife erklärbar. Von KIRKMAN et al. (1982) wurden bei N-Gaben entsprechend 750 (N₂) bzw. 1500 (N₃) kg N ha⁻¹ im reifen Korn von 'Bomi' N_{GLU}-Mengen von 269 µg bzw. 330 µg bestimmt [58]. Die EKG (mg) und Gesamt-N-Massenanteile (% TM) betrugen für N₂ 58,8 und 1,82 sowie 51,8 und 2,57 für N₃. In der vorliegenden Arbeit wurde für 'Bomi' zur Reife ein EKG von 59 mg und ein Gesamt-N-Massenanteil von ca. 2,4 % TM bestimmt. Dies zeigt zum einen, dass die Pflanzen ähnlich gut mit Stickstoff versorgt waren, wie jene in der erwähnten Studie (siehe 3.2). Zum anderen ist damit zu erwarten, dass die N_{GLU}-Menge bis zur Reife weiter bis zu Werten ähnlich den berichteten [58] anstieg und somit 20 dpa 25 - 42 % der finalen Menge erreicht waren.

Gesamtbetrachtung für N in den Proteinfractionen

Die Risø Mutanten 16 und 13 sind als *high-lys*-Mutanten bekannt [32, 47]. Dies bedeutet, dass der Lysingehalt des Gesamtproteins gegenüber dem Wildtyp erhöht ist. Da ferner bekannt ist, dass Hordeine die dominante Proteinfraction bei Gerste darstellen und arm an Lysin sind ergibt sich, dass deren Menge und/oder Massenanteil am Gesamtprotein bei den Mutanten erniedrigt ist [53, 37, 58, 61, 98]. Wie zuvor diskutiert, war die N_{AG}-Menge im frühen Stadium der Endospermentwicklung bei den Mutanten gegenüber dem Wildtyp erhöht. Der Wiederholungsversuch 2010 lässt zudem nicht ausschließen, dass dies auch in späteren Stadien gültig ist. Die N_{HOR}-Menge und auch der N_{HOR}-Massenanteil an der Trockenmasse der Endosperme von Risø 16 und 13 hingegen blieb mit dem Fortschreiten der Kornfüllung hinter jener des Wildtyps zurück. Für die Gluteline zeigt sich ein entgegengesetztes Bild; die N_{GLU}-Mengen stiegen bei den Mutanten gegenüber 'Bomi' mit zunehmender Dauer nach Anthese stärker an. Da die Unterschiede in den N_{AG}-Mengen in Relation zum Gesamtprotein gering ausfielen und nach 20 dpa keine starken Zuwächse in dieser Fraction zu erwarten sind, ist damit der erhöhte Lysingehalt im reifen Korn der Mutanten wahrscheinlich zum größten Teil durch ein verändertes Verhältnis von Hordein zu Glutelin bedingt. Die Anteile der HOR- und GLU-Fractionen am extrahierten Gesamtprotein (Abb. 40) zeigen allerdings auch, dass der Anteil der Hordeine bei den Mutanten zwischen 14 und 20 dpa stär-

ker anstieg als beim Wildtyp und jener der Gluteline zumindest im Fall von Risø 13 tendenziell zurückging.

Die vorherigen Ausführungen zusammenfassend ergibt sich folgendes Gesamtbild: Die Albumin/Globulin-Synthese ist im frühen Stadium nach der Anthese (bis ca. 14 - 20 dpa) bei den Mutanten gegenüber dem Wildtyp erhöht. Hierdurch wird die Bildung von Hordeinen gehemmt bzw. es steht weniger Stickstoff für die Bildung dieser Fraktion zur Verfügung, da die *Sink*-Stärke der AG-Fraktion für Stickstoff stärker ist. Die Glutelin-Fraktion ist von diesen Vorgängen bis 14 dpa nicht beeinflusst. Nach ca. 14 dpa kommt es, zumindest bei Risø 16, zu einer partiellen Degradation der AG-Fraktion welche sich bis ca. 20 dpa fortsetzt. Der aus dieser Fraktion freigesetzte Stickstoff fließt möglicherweise z. T. in die GLU-Fraktion, da bei dieser zu 20 dpa die N_{GLU} -Menge gegenüber dem Wildtyp höher ausfiel. Die verzögerte Bildung der Hordeine wird bei den Mutanten im Anschluss durch eine im Vergleich zu 'Bomi' erhöhte Syntheserate kompensiert (Abb. 36, Abb. 40). Dies ergibt sich durch die höheren Rohproteingehalte im reifen Korn bei Risø 16 und Risø 13 gegenüber 'Bomi' (Tab. 10). Da die Mutanten im reifen Korn einen höheren Lysingehalt aufweisen [32, 47], ist zu vermuten, dass auch die N_{GLU} -Menge bei diesen im Vergleich zum Wildtyp bis zur Reife stärker ansteigt und der Massenanteil am Gesamtprotein final höher ausfällt.

¹⁵N: aktuell assimilierter Stickstoff in den Proteinfractionen

Der ¹⁵N-Überschuss [µg] in den Proteinen ist ein Maß für den Stickstoff welcher in Form von NH_4^+ in den vier Tagen vor den Probenahmen aufgenommen wurde. Je geringer dieser Überschuss ausfällt, desto weniger des aktuell aufgenommenen Stickstoffs wurde dementsprechend in die Fraktion eingelagert und desto größer ist der Anteil des zwischen Anthese und Markierung direkt von der Wurzel ins Korn verlagerten und/oder vor der Markierung in vegetativen Organen eingelagerten und später remobilisierten Stickstoffs (Verdünnungseffekt). Zu beachten ist dabei, dass die natürliche Anreicherung in den Proteinfractionen in Folge von Isotopeneffekten, vor allem kinetischen, nicht identisch ist. In einer Studie zur Untersuchung des Beitrages mobilisierten Kohlen- und Stickstoffs zur Kornfüllung bei Mais wurde dies berichtet [30]. Die $\delta^{15}N$ -Werte in der Kontrollvariante betrugen 9,3 für AG, 7,4 für GLO, 11,6 für

Zein (Prolaminfraktion) und 7,8 - 5,3 für die GLU-Fraktionen G1 bis G3 (Subfraktionen). Als mögliche Ursache für die unterschiedliche ^{15}N -Anreicherung in der Zein- und Glutelin-G3-Fraktion (11,6 vs. 5,3) wurde auf die unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung der Fraktionen in Zusammenhang mit deren unterschiedlicher Herkunft verwiesen. Für die Betrachtung der nachfolgenden Ergebnisse sind die Verhältnisse in den vegetativen Organen und im Gesamt-Endosperm zu berücksichtigen. Trotz diverser Tendenzen (siehe 5.5) wurde nur im Fall der Sprossachse zu 20 dpa (2009) ein signifikanter Unterschied zwischen Risø 13 und den anderen Genotypen festgestellt.

Der ^{15}N -Überschuss in den Proteinfractionen im ersten Hauptversuch zeigte tendenziell ein ähnliches Bild wie die entsprechenden N-Mengen. Abweichungen bestanden darin, dass in keinem Fall signifikante Einflüsse des Genotyps nachgewiesen wurden. Für die AG-Fractionen der Mutanten sanken die ^{15}N -Überschusswerte zu 20 dpa in Relation zu 14 dpa tendenziell stärker als die entsprechenden N_{AG} -Mengen. Im Fall von 'Bomi' blieb der ^{15}N -Überschuss in der AG-Fraktion konstant während die N_{AG} -Menge anstieg. Die Verhältnisse in der HOR-Fraktion waren für den ^{15}N -Überschuss und die N_{HOR} -Menge sehr ähnlich. In der GLU-Fraktion sank der ^{15}N -Überschuss im Fall von 'Bomi' und Risø 13 tendenziell zwischen 14 und 20 dpa und blieb bei Risø 16 nahezu unverändert. Bei dem Vergleich der Versuchsjahre für den ^{15}N -Überschuss gab es in der Tendenz keine Unterschiede zur N-Menge in den Fraktionen. Wie aus Tab. 12 ersichtlich wurde in der Summe der Proteinfractionen zu 20 dpa gegenüber 14 dpa bei allen Genotypen, besonders Risø 16 ein tendenziell höherer ^{15}N -Überschuss festgestellt. Im Fall von Risø 16 und in geringerem Ausmaß bei 'Bomi' bestand dieser Trend auch für den ^{15}N -Überschuss im Gesamt-Endosperm, wohingegen dieser bei Risø 13 etwas zurückging. Berücksichtigt man zusätzlich den stärkeren Verdünnungseffekt zu 20 dpa, d. h. die stärkere Einlagerung unmarkierten Stickstoffs (vgl. Abb. 32), zeigt dies noch einmal, dass der Beitrag des aktuell assimilierten Stickstoffs zur Kornfüllung von 14 zu 20 dpa etwas zunahm.

Der Beitrag des aktuell assimilierten Stickstoffs in den einzelnen Fraktionen wird am besten bei dem Vergleich der Anteile der Fraktionen am gesamt-extrahierten N und ^{15}N deutlich (Tab. 23). Im Mittel aller Genotypen und Be-

probungstermine ist der Anteil der AG- und GLU-Fraktion am gesamt-extrahierten ^{15}N um 3,7 bzw. 10,6 Prozent niedriger als der Anteil der jeweiligen Fraktion am gesamt-extrahierten N. Der Beitrag der Hordeine zur Summe des extrahierten ^{15}N fällt hingegen im Mittel um 14,3 % höher aus im Vergleich zum Anteil am extrahierten N. Für 'Bomi' lag der $^{15}\text{N}_{\text{AG}}$ -Anteil am $^{15}\text{N}_{\text{Gesamt}}$ zu 14 dpa 2,5 % und zu 20 dpa 4,0 % niedriger als der N_{AG} -Anteil am N_{Gesamt} . Dies erklärt sich dadurch, dass die Gesamt-N-Parameter die Verhältnisse ab der Anthese, die ^{15}N -Werte jedoch den Zeitraum von 10 - 14 dpa bzw. 16 - 20 dpa widerspiegeln. Da die Bildung Albumine und Globuline bereits vor 10 dpa einsetzt (siehe Gesamt-N im Korn), kommt es zur Verdünnung des ^{15}N . Zusätzlich spielen wahrscheinlich auch bei Gerste Isotopeneffekte eine Rolle. Wie zuvor erwähnt, lag der $\delta^{15}\text{N}$ -Wert der Prolaminfraktion bei Mais deutlich höher als jener der AG-Fraktion [30]. Somit fließt bei gleichen Einlagerungsraten mehr ^{15}N in die Hordeinfraktion und der ^{15}N -Anteil der AG-Fraktion verringert sich gegenüber dieser. Das Absinken des $^{15}\text{N}_{\text{AG}}$ -Anteils am $^{15}\text{N}_{\text{Gesamt}}$ von 14 zu 20 dpa, welches bei allen Genotypen auftrat, erklärt sich durch einen stärkeren Verdünnungseffekt und rückläufige Stickstoffflüsse in die AG-Fraktion. Für 'Bomi' lagen die ^{15}N -Anteile am $^{15}\text{N}_{\text{Gesamt}}$ für die Hordeine und Gluteline 16,6 % über bzw. 14,1 % unter den entsprechenden N-Anteilen am N_{Gesamt} . Dies zeigt in erster Linie, dass die Hordeine zu diesem Zeitpunkt die stärkste Senke für aktuell assimilierten Stickstoff darstellen. Geht man in Abgleich mit den Literaturangaben davon aus, dass die Proteinsynthese in beiden Fraktionen vor 10 dpa sehr gering ist, spielt der Verdünnungseffekt kaum eine Rolle. Auch in diesem Fall ist es wahrscheinlich, dass natürliche Anreicherung in der Prolamin-Fraktion gegenüber der GLU-Fraktion höher ist, wie es für Mais berichtet wurde [30]. Eine weitere Ursache kann die unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung beider Fraktionen sein [30], wodurch die N-Speisung in verschiedenen Verhältnissen aus unterschiedlichen Quellen erfolgte. Diese Quellen sind zum einen das aktuell assimilierte $^{15}\text{NH}_4^+$, welches in stärkerem Ausmaß in die Hordeine geleitet wurde sowie aus den vegetativen Organen remobilisierter Stickstoff und aktuell assimiliertes Nitrat (unmarkiert), welche stärker zur Bildung der Gluteline beitrugen. Zu 20 dpa lagen bei 'Bomi' die ^{15}N -Anteile am $^{15}\text{N}_{\text{Gesamt}}$ für die Hordeine und Gluteline 13,1 % über bzw. 9,1 % unter den entsprechenden N-Anteilen am N_{Gesamt} .

Diese Veränderungen erklären sich durch eine stärkere Verdünnung in der Hordeinfraction, die rückläufige Einlagerung in die AG-Fraktion und ein wahrscheinlich verändertes Verhältnis der HOR- und GLU-Syntheseraten. Im Fall der Mutanten wurde ein anderes Bild beobachtet. Das Verhältnis des ^{15}N -Anteils am $^{15}\text{N}_{\text{Gesamt}}$ zum N-Anteil am N_{Gesamt} war zu 20 dpa gegenüber 14 dpa für die Hordeine niedriger und Gluteline höher. Das heißt, zu 20 dpa wurde im Vergleich zu 14 dpa ^{15}N in noch stärkerem Ausmaß als Gesamt-N in die Hordeinfraction geleitet, während für Gluteline das Gegenteil beobachtet wurde. Dies steht im Einklang mit den unterschiedlichen Bildungsdynamiken beider Fraktionen bei den Mutanten im Vergleich mit dem Wildtyp, besonders der verzögerten HOR-Synthese gegenüber dem Wildtyp.

Tab. 23: Gegenüberstellung der Mittelwerte der prozentualen Anteile der Proteinfractionen am gesamt-extrahierten N und ^{15}N für die Genotypen 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 zu 14 und 20 dpa im ersten Hauptversuch (2009).

Protein-fraktion	Anteil [%]	'Bomi'		Risø 16		Risø 13	
		14 dpa	20 dpa	14 dpa	20 dpa	14 dpa	20 dpa
Albumin/ Globulin	N_{gesamt}	9,69	9,03	37,68	12,27	23,24	10,19
	$^{15}\text{N}_{\text{gesamt}}$	7,20	5,04	31,58	8,43	19,91	7,76
Hordein	N_{gesamt}	51,89	67,09	22,32	49,21	28,43	52,46
	$^{15}\text{N}_{\text{gesamt}}$	68,46	80,18	34,28	67,57	39,87	66,70
Glutelin	N_{gesamt}	38,42	23,88	40,00	38,53	48,32	37,35
	$^{15}\text{N}_{\text{gesamt}}$	24,33	14,79	34,14	24,01	40,21	25,53

5.7 Bewertung des Verfahrens zur Proteinextraktion

Die Ergebnisse der Proteinextraktion konnten, wie in Abb. 37 zu sehen zwischen den Versuchsjahren (20 dpa) gut reproduziert werden. Die Streuung der Werte fiel relativ gering aus, wobei zu beachten ist, dass der Proteingehalt im Korn laut Literaturangaben stark durch die Umweltbedingungen beeinflusst wird ([60] und Autoren darin). Dennoch ist das Protokoll weiter optimierbar. In der vorliegenden Arbeit wurde der Stickstoffgehalt in den extrahierten Fraktionen ausgewertet, da die Fraktionen wie aus Tab. 13 (4.1.9) ersichtlich

Verunreinigungen durch Nicht-Protein-Substanzen enthielten. Da dies vor allem bei der AG- und GLU-Fraktion der Fall war, ist zu vermuten, dass hauptsächlich Pufferreste hierfür verantwortlich waren (Salze, SDS). Für eine Optimierung in zukünftigen Experimenten ist eine Dialyse der Extrakte empfehlenswert, wie sie in anderen Arbeiten durchgeführt wurde [37, 33, 96]. Wie unter 4.1.9 beschrieben, betrug die Wiederfindungsrate des Stickstoffs in der Summe der extrahierten Proteinfractionen zwischen 50 - 63 % des Stickstoffs im Gesamtendosperm. In einer Arbeit von KIRKMAN et al. (1982) wurden für reife Körner von 'Bomi' bei hoher Stickstoffversorgung 8,9 % N_{AG} (von N_{total}), 52,7 % N_{HOR} , 24,9 % N_{GLU} , 8,2 % N_{NPN} sowie 2,6 % N im Extraktionsrückstand bestimmt und die Wiederfindungsrate betrug 97,3 % [58]. Das Extraktionsprotokoll war dem in der vorliegenden Arbeit sehr ähnlich, doch die Einwaage war mit 1 g höher. Es stellt sich die Frage, welche Gründe zu den deutlich geringeren Wiederfindungsraten bei der Verwendung eines sehr ähnlichen Protokolls führten. Eine Hauptursache, welche bereits unter 4.1.9 dargestellt wurde, ist die Korrelation der Wiederfindungsrate mit der verwendeten Einwaage. Die für diesen Zusammenhang erstellte Regressionsgerade ergab, dass mit einer Einwaage von 527 mg eine Wiederfindungsrate von 80 % erreicht worden wäre. Die tatsächlich verwendeten Einwaagen lagen jedoch zwischen 100 und 300 mg. Bei der Verwendung von kleinen Proben wirken sich Verluste, welche beim Abnehmen von Überständen und dem Überführen von Proben zwischen Reaktionsgefäßen auftreten, stärker aus. Mit dem vorliegenden Versuchsdesign sind die Probenmassen jedoch nicht beliebig steigerbar, da die Präparation der Endosperme, d. h. deren Befreiung vom Perikarp, sehr zeitaufwändig ist und das maximale Probenaufkommen limitiert. Ein Ansatz für zukünftige Versuche ist die Verwendung ganzer Karyopsen oder nur den Embryo zu entfernen. Ein weiterer Faktor, welcher zu niedrigeren Wiederfindungsraten in der vorliegenden Arbeit führte, ist, dass NPN und der Stickstoffanteil im Extraktionsrest nicht bestimmt wurde. Beide Fraktionen trugen in der Arbeit von KIRKMAN et al. (1982) 10,8 % zum Gesamtprotein bei [58]. Dabei ist es wahrscheinlich, dass zu 20 dpa, dem Bildungsstadium der Speicherproteine, der Anteil niedermolekularer Stickstoffverbindungen noch höher ausfällt als zur Reife. Weiterhin ist zu vermuten, dass im Zuge des Entfettungsschrittes mit Butanol amphiphile Proteine mit entfernt wurden. Von

RAHMAN et al. (1982) wurde berichtet, dass sich bis ca. 34 dpa 10 % des Gesamt-N in dieser Fraktion fanden und der Anteil bis zur Reife auf etwa 5 % sank [37]. Dies bedeutet, dass ein Teil der geringeren Wiederfindungsrate durch diese Fraktion bedingt sein kann.

5.8 Bewertung der ^{13}C -/ ^{15}N -Doppelmarkierung

Die Ergebnisse des ersten Hauptversuches und die weitgehend gut reproduzierten Ergebnisse im zweiten Hauptversuch belegen, dass das angewendete Verfahren zur ^{13}C - und ^{15}N -Pulsmarkierung für die Untersuchung der Kohlenstoff- und Stickstoffverlagerung in der Pflanze geeignet ist. Es wurde eine ausreichend hohe Markierung erzeugt, welche die Verlagerung von Kohlenstoff und Stickstoff aus den Blättern bzw. der Wurzel nachverfolgbar machte. Gleichzeitig überstieg die Höhe des ^{13}C -Labels nicht die, für die massenspektrometrische Analyse kritische Grenze. Einschränkungen dieser Methode bestehen bei der Quantifizierbarkeit der Stoffverlagerungen. Für derartige Untersuchungen bieten sich Langzeitmarkierungen, z. B. über die gesamte Dauer der vegetativen Phase, in Kombination mit hydroponischer Kultur an. Auf diese Weise ist das Wurzelsystem zugänglich und es ist möglich, exakte Aufnahmezeiten sowie Bilanzen für die Gesamtpflanze über bestimmte Zeiträume zu erstellen. Der Nachteil von Langzeitmarkierungen besteht hingegen in einem hohen Tracerverbrauch und den damit verbundenen Kosten. Wie unter Punkt 4.1.10 bereits dargelegt, wurden zu 8 dpa keine Veränderungen hinsichtlich der Trockenmasse sowie des Gesamt-C und -N beim Vergleich von unmarkierter Kontrolle und markierter Variante festgestellt. Dies zeigt, dass auf Gesamtpflanzenebene keine Stressreaktionen infolge der Behandlung, d. h. des einstündigen Einschließens der Pflanzen in ein abgeschlossenes Behältnis, sichtbar wurden. Für zukünftige Versuche ist es dennoch sinnvoll, für eine Kühlung während der Markierung zu sorgen wie in [102] berichtet, um einen Temperaturanstieg und zu hohe Luftfeuchtigkeit zu vermeiden.

Wie aus Tab. 15 (4.1.10) ersichtlich, wurde auch in den unmarkierten Kontrollpflanzen in allen untersuchten Organen eine Anreicherung mit ^{15}N festgestellt. Für die ^{15}N -Überschusswerte in den Organen der unmarkierten Pflanzen gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen erfolgte die Berech-

nung der Werte mit atmosphärischem Stickstoff als Standard. Für Boden, die Haupt-Stickstoffquelle der Pflanzen, wurden $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von - 3 bis 8 ‰ berichtet [105]. Würde der Bodenstickstoff ohne Diskriminierung in den organischen Stickstoffpool der Pflanze gelangen, ergibt sich somit bereits eine Anreicherung. Es ist möglich, dass der $\delta^{15}\text{N}$ -Wert des Substrates noch über dem berichteten (- 3 bis 8 ‰) lag, denn dieses enthielt Kompost und Torf. Von KRAMER et al. (2003) wurde festgestellt, dass der $\delta^{15}\text{N}$ -Wert von organischer Masse mit der Humifizierung durch mikrobiellen Abbau steigt [106]. Der aus dem organischen N-Speicher freigesetzte Stickstoff wäre demnach höher mit ^{15}N angereichert. Weiterhin können Prozesse im Stickstoffkreislauf, bei welchen ^{15}N diskriminiert wird, zu einer ^{15}N -Anreicherung des pflanzenverfügbaren N-Pools führen. Von besonderer Bedeutung sind dabei Nitrifikation (0 - 35 ‰), das $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ Equilibrium (20 - 27 ‰), NH_3 -Verdunstung (29 ‰), N_2O - und NO -Produktion bei der Nitrifikation (0 - 70 ‰) und Denitrifikation (0 - 39 ‰) ([103] und Autoren darin). Der ^{15}N -Anreicherung im Substrat steht die ^{15}N -Diskriminierung bei der Stickstoffassimilation in der Pflanze gegenüber, welche zu einer Abreicherung gegenüber dem Substrat führen kann. Die Diskriminierung der wichtigsten Enzyme Nitrat-Reduktase und Glutamin-Synthetase beträgt 15 ‰ bzw. 17 ‰. Das Ausmaß der Diskriminierung ist jedoch hoch variabel und stark von der Konzentration des pflanzenverfügbaren Stickstoffs im Substrat abhängig [104]. Bei geringen N-Konzentrationen wird (nahezu) der gesamte Stickstoff aufgenommen und damit auch der gesamte ^{15}N , wodurch es zu keiner Fraktionierung mehr kommt. In der vorliegenden Arbeit ist jedoch nicht von einer geringen Stickstoffversorgung auszugehen, obgleich die N-Menge nur im Ausgangssubstrat bestimmt wurde und somit nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese z. B. zwischen Schosser- und Ährengabe auf ein niedriges Niveau absank. Weitere Parameter, welche das Ausmaß der Diskriminierung beeinflussen, sind der Anteil des Nitrates und Ammonium am assimilierten Stickstoff sowie der Ort der Nitratreduktion (Blatt/Wurzel). Es wurde berichtet, dass bei NO_3^- gegenüber NH_4^+ als Haupt-un-Quelle in der Pflanze eine stärkere Variation der $\delta^{15}\text{N}$ -Werte auftritt. Dies ergibt sich durch die Tatsache, dass die NH_4^+ -Assimilation im Normalfall vollständig in der Wurzel erfolgt und der organische Stickstoff in Spross und Blättern dann das Produkt dieses Prozesses ist [104]. Wie in

Tab. 15 (4.1.10) zu sehen, war dies in den durchgeführten Versuchen nicht der Fall und es wurde eine niedrigere Anreicherung in den Blättern gegenüber der Sprossachse beobachtet. In diesem Zusammenhang ist jedoch der Stickstoffmassenanteil an der Trockenmasse der Organe zu beachten, welche in den Sprossachsen gegenüber den Blättern niedriger ausfiel (Abb. 20), wodurch sich eine stärkere Isotopenverdünnung in den Blättern ergibt. Es ist dennoch anzunehmen, dass NO_3^- die vorrangig aufgenommene N-Form war. Durch die Nitratreduktion in der Wurzel und der damit einhergehenden Diskriminierung steigt die ^{15}N -Anreicherung im freien Nitrat-Pool aus welchem NO_3^- über das Xylem in die Blätter gelangt [104]. Damit ergibt sich eine höhere ^{15}N -Anreicherung des organischen Stickstoffs im Blatt. Gleichzeitig erfolgt eine weitere Anreicherung des verbleibenden freien Nitrates im Blatt. Würde dieses zumindest teilweise über das Phloem zurück zur Wurzel transportiert, wäre die noch höhere Anreicherung in der Sprossachse zu erklären. Ebenso ist es möglich, dass das gesamte Nitrat im Blatt assimiliert wird, jedoch der Großteil der ^{15}N -angereicherten Aminosäuren über das Phloem exportiert wird. Von COOPER et al. (1989) wurde diesbezüglich ein Modell für einen Stickstoffkreislauf zwischen oberirdischen Organen und Wurzel entwickelt, wobei kalkuliert wurde, dass 50 % des N-Flusses im Xylem zirkulierenden Stickstoff darstellt und im Mittel jedes N-Molekül einmal zirkuliert, bevor es für das Wachstum genutzt wird [107]. Die Schlussfolgerung aus den Daten der unmarkierten Kontrollen ist, dass die Werte der markierten Pflanzen nicht zu einhundert Prozent die Markierung bzw. die Aufnahme nach der Anthese widerspiegeln und etwas zu hoch ausfallen. Es wurde dennoch nicht mit Nettowerten (markiert abzüglich unmarkiert) gerechnet, da für die Termine 14 und 20 dpa keine Kontrolle mitgeführt wurde.

Hinsichtlich der ^{15}N -Markierung ist weiterhin zu beachten, dass die mit Ammoniumchlorid-Applikation erzielten Ergebnisse nicht vollständig auf die Bedingungen im Feldanbau übertragbar sind. Im Ackerbau finden sich im Boden NO_3^- -Konzentrationen von ca. 0,5 - 10 mM, während die NH_4^+ -Konzentrationen meist 100 - 1000-fach niedriger liegen und nur selten, z. B. nach Düngung, den millimolaren Bereich erreichen [99]. Hingegen erhielten die Pflanzen in den Versuchen 150 Milliliter einer 6,3 mM Ammoni-

umchlorid-Lösung, was einer Menge von 18,1 mg Ammonium entspricht. Der Vorteil des hohen Ammoniumangebotes besteht darin, dass die Pflanzen dies wahrscheinlich gegenüber Nitrat bevorzugt aufnehmen, was dazu führt, dass die Markierung in der Pflanze die aktuelle N-Assimilation gut reflektiert. In der Literatur wurde für Mais die bevorzugte Aufnahme von NH_4^+ gezeigt, wenn beide Stickstoffformen verfügbar sind, jedoch unter N-limitierten Bedingungen [100]. Der Nachteil besteht darin, dass die beobachteten Vorgänge in der Pflanze von denen unter Feldanbaubedingungen abweichen, wo zum einen meist Nitrat die dominante N-Form im Boden ist und die Pflanzen zum anderen zu Terminen wie 10 oder 16 dpa keinen solch hohen N-Puls erhalten. In einer Studie mit Tomaten welche mit zur Anthese markiertem Nitrat und Ammonium gedüngt wurden, konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass sich der NO_3^- -Stickstoff vor allem in den Blattscheiden und in geringem Ausmaß in Blattstielen, Früchten und Sprossachsen wiederfand, während der NH_4^+ -Stickstoff sich in größeren Mengen in den Blättern fand aber auch in den Früchten eingelagert wurde [101]. Dies deutet auf unterschiedliche Verteilungswege für Stickstoff aus NO_3^- und NH_4^+ hin.

Wie für ^{15}N wurde auch für ^{13}C eine geringe Anreicherung über Null in den Organen der unmarkierten Kontrollpflanzen zu 8 dpa bestimmt (Tab. 15). Dies ist auf den verwendeten Standard Harnstoff zurückzuführen, da dieser nicht der natürlichen Kohlenstoffzusammensetzung entspricht (siehe [52] und 3.7.4.). Eine Korrektur der Werte markierter Pflanzen wurde auch in diesem Fall nicht durchgeführt, da zum einen keine Kontrollpflanzen für die Termine 14 und 20 dpa mitgeführt wurden und zum anderen fehlen aufgrund von Probenausfällen die Werte der Sprossachse der unmarkierten Kontrolle zu 8 dpa.

5.9 Bestockungstriebe

Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf der Untersuchung der Vorgänge im Haupttrieb. Ein Grund hierfür war, dass der C- und N-Status zu festgelegten Terminen nach der Anthese untersucht wurde. Bedingt durch die Markierung ganzer Pflanzen und die asynchrone Entwicklung der einzelnen Triebe einer Pflanze ist dies nur für einen Trieb exakt durchführbar. Der Haupttrieb wurde dabei als repräsentativ für die Gesamtpflanze betrachtet.

In den durchgeführten Versuchen betrug die Anzahl der Bestockungstriebe 23 bis 32. Dies sind in Abgleich mit Literaturberichten sehr hohe Werte. Unter normalen Anbaubedingungen (Feld) werden pro Pflanze zwei bis vier Triebe gebildet und bei verringerter Saatedichte von einem etwas höheren Wert von fünf Trieben pro Pflanze berichtet [108]. Von PAULY et al. (2001) wurde für einen Gefäßversuch mit Gerste eine steigende Anzahl von Bestockungstrieben in Abhängigkeit von der P-Versorgung festgestellt. Dabei stieg die Anzahl der Bestockungstriebe von 0 über 12 auf 19,3 bei Gabe von 0, 15,7 bzw. 31,4 mg P pro Gefäß [109]. Von SPRATT und GRASSER (1970) wurde festgestellt, dass höhere N-Gaben in der frühen Entwicklung zu stärkerer Bestockung führen [110]. GARCÍA DEL MORAL et al. (1995) wies außerdem darauf hin, dass die Bestockung bei Gerste wahrscheinlich durch die Umweltbedingungen beeinflusst wird, was möglicherweise auch die Lichtqualität einschließt [111]. Wie unter Punkt 3.2 nachzulesen, war die Stickstoffversorgung der Versuchspflanzen sehr gut. Durch den Kompostanteil im Substrat und die Düngung mit Plantacote 4M und Hakaphos Grün ist ebenfalls von einer guten Phosphatversorgung auszugehen. Weiterhin kommen die Kultur als Solitärpflanzen und die Umweltbedingungen im Gewächshaus, z. B. die Lichtqualität, als Ursachen für die sehr hohe Bestockung in Frage.

Wie in Kapitel 4.2 erläutert stieg die Trockenmasse der Sprossachsen der Bestockungstriebe im ersten Hauptversuch von 8 zu 20 dpa signifikant an. Am Haupttrieb war dies 2009 im Fall von Risø 13 ebenfalls deutlich erkennbar, bei den anderen Genotypen bestand diesbezüglich nur ein minimaler Trend. Für die Bestockungstriebe erklärt sich dies zum einen durch die gegenüber dem Haupttrieb nachlaufende Entwicklung vor allem spät gebildeter Triebe und die damit einhergehende Bildung von Strukturkomponenten in der Sprossachse. In einer Studie von BONNETT et al. (1992) wurde beobachtet, dass die Trockenmassen der Sprossachsen von Wintergerste 18 bis 25 Tage nach Anthese anstiegen und nach Erreichen des Maximums abfielen [112]. Andere Autoren stellten bei weiteren Sorten Anstiege bis 8 - 21 dpa [113], 14 - 18 dpa [114] und unter anderen Umweltbedingungen bis 18 - 24 dpa [115] fest. Von BONNETT et al. (1992) wurde postuliert, dass nach Deckung des Bedarfs für die Kornfüllung und die Bildung von Strukturkomponenten überschüssige Assimili-

late, vor allem in Form von wasserlöslichen Kohlenhydraten (z. B. Fructane) als Speicher in der Sprossachse eingelagert werden [112]. Auch dies ist eine Erklärungsmöglichkeit für die ansteigenden Trockenmassen der Bestockungstriebe sowie die tendenzielle bzw. deutliche Trockenmassezunahme am Haupttrieb bei 'Bomi', Risø 16 und Risø 13. Die unterschiedliche zeitliche Entwicklung der Sprossachse des Haupttriebes von 'Bomi' und Risø 16 gegenüber Risø 13 lässt vermuten, dass es sich dabei um einen dynamischen und komplexen Prozess handelt. Es ist möglich, dass bei 'Bomi' und Risø 16 mehr "überschüssige" Assimilate aus dem Haupttrieb in die Bestockungstriebe verlagert wurden oder bei Risø 13 eine stärkere Assimilatallokation aus den Bestockungstrieben in den Haupttrieb erfolgte. Die Verlagerung von Assimilaten zwischen Bestockungstrieben und Haupttrieb wurde in der Vergangenheit mehrfach beschrieben. In einer Studie von LAUER und SIMMONS (1988) an Gerste wurde durch Markierungsexperimente mit Radio-Kohlenstoff der Kohlenstofffluss zwischen Bestockungstrieben und Haupttrieb untersucht. Dabei fungierte der Haupttrieb im frühen Stadium der Bestockung als C-Quelle und wurde mit fortschreitender Entwicklung netto zu einer Hauptsenke, wobei besonders Bestockungstriebe, welche vor der Anthese abstarben, als C-Quelle fungierten. In dieser Arbeit war der Assimilatfluss ab dem Erscheinen des Fahnenblattes jedoch nahezu null [116]. Unter der Annahme, dass diese Ergebnisse auf die vorliegende Arbeit übertragbar sind, hätte die Verlagerung von C-Assimilaten zwischen Haupt- und Bestockungstrieben nach der Anthese keine Rolle gespielt. Es ist jedoch auch möglich, dass durch die hohe Anzahl an Bestockungstrieben und deren gegenüber dem Haupttrieb teils stark nachlaufende Entwicklung noch Assimilatverlagerungen über das Stadium der Fahnenblattentfaltung am Haupttrieb hinaus stattfanden. Von FATHI et al. (1997) wurde diesbezüglich vermutet, dass die relativen Entwicklungsstadien (Synchronität) der Bestockungstriebe einer Pflanze sowohl das Ausmaß der Trockenmasse- und Stickstoffremobilisierung, als auch die Verteilung von Trockenmasse und Stickstoff zwischen Bestockungstrieben und Haupttrieb beeinflussen [117]. Weitere Studien ergaben, dass unter zunehmendem Stress mehr Trockenmasse und Stickstoff von den spät gebildeten Bestockungstrieben in den Haupttrieb und die früh gebildeten Bestockungstriebe verlagert werden, aber das Ausmaß dieser Verlagerungen vom Entwicklungs-

stadium der Bestockungstriebe zum Zeitpunkt des Eintretens des Stresses beeinflusst wird [118, 119, 120]. Die Daten einer Studie von MUURINEN et al. (2007) ließen vermuten, dass vor allem im späten Stadium der Kornfüllung remobilisierter Stickstoff von den Bestockungstrieben in den Haupttrieb verlagert wird [121]. Bei Übertragbarkeit der Daten würde letzteres bedeuten, dass dieser Prozess für den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zeitraum bis 20 dpa nicht ausgeprägt war.

Für die Blätter der Bestockungstriebe (2009) wurde ebenso wie für jene der Haupttriebe kein Einfluss des Prüffaktors Probenahmetermin hinsichtlich der Trockenmasse festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass im Untersuchungszeitraum keine nennenswerte Remobilisierung von Kohlenstoff und Stickstoff aus diesem Organ erfolgte. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass durch diesen Parameter nicht erfasst wird, wenn remobilisierte und exportierte Assimilate durch aktuell assimilierte ersetzt werden. Für die Bestockungstriebe ist keine Aussage zu treffen inwiefern Stoffe aus seneszenten Organen ausgelagert wurden und parallel eine Einlagerung in jüngere Organe erfolgte. Von BONNETT et al. (1992) wurde ein potentieller Assimilatbeitrag der Blätter zur Kornfüllung bei Wintergerste von 8,8 % - 25,2 % kalkuliert [112].

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass von Anthese bis 20 dpa keine Remobilisierung von Trockenmasse in Haupt- und Bestockungstrieben festgestellt wurde. Nach Literaturangaben neigen Pflanzen in Gefäßkultur gegenüber dem Anbau im Feld dazu, gespeicherte Assimilate in geringerem Ausmaß für die Kornfüllung zu nutzen [122, 113, 123]. Eine Studie von FUERTES MENDIZÁBAL et al. (2010) zum Beitrag remobilisierter Kohlenstoffassimilate zur Kornfüllung bei Weizen ergab, dass dieser vor allem in der späten Kornfüllungsphase (> 24 dpa) substantiell ist. Weiterhin sorgte eine gute N-Versorgung zur einem höheren Beitrag der aktuellen Assimilation zur Kornfüllung, änderte jedoch nicht den Beitrag der Sprossachse [124]. Letzteres kann eine Ursache für die fehlende Remobilisierung von Trockenmasse aus den Blättern in den Versuchen sein. Untersuchungen bei Gerste ergaben ebenfalls, dass remobilisierter Kohlenstoff und Stickstoff vor allem in der späten Kornfüllungsphase einen substantiellen Beitrag leisten [112, 121]. Zuvor genannte Quellen deuten darauf hin, dass eine Mobilisierung von Trockenmasse zwischen Anthese

und 20 dpa nicht beobachtet wurde, weil diese möglicherweise erst zu einem späteren Zeitpunkt, mit stark voranschreitender Seneszenz aller Blattorgane und damit einhergehender Abnahme der aktuellen Assimilation eine Rolle spielt. Eine Verlagerung von Assimilaten zwischen Haupt- und Bestockungstrieben kann nach Literaturberichten nicht ausgeschlossen werden, ist jedoch mit den vorhandenen Daten nicht zu überprüfen.

6 Schlussfolgerungen

Die drei untersuchten Genotypen zeigten keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich TM und C-Massenanteil der vegetativen Organen, jedoch bestanden Hinweise, dass die Stoffeinlagerung in die Sprossachse von Risø 13 länger anhält und in stärkerem Ausmaß erfolgt. Ein substanzieller Beitrag von remobilisiertem Kohlenstoff aus dem Haupttrieb zur Kornfüllung wurde somit bis 20 dpa nicht festgestellt. Eine signifikante Korrelation zur N-Menge in den Endospermen von 8 bis 20 dpa wurde nur für die Sprossachse von 'Bomi' und die Blätter von Risø 16 gefunden. Anhand der abnehmenden N-Mengen in den vegetativen Organen des Haupttriebes sind Beiträge remobilisierten Stickstoffs zur Kornfüllung von 47 %, 99 % und 0 % für 'Bomi', Risø 16 und Risø 13 möglich. Durch überlagernde Vorgänge wie N-Verluste an die Atmosphäre, parallele N-Einlagerung in die vegetativen Organe und Interaktionen mit den Bestockungstrieben und der Wurzel sind keine gesicherten Aussagen hierzu möglich.

Die Trockenmassen der Endosperme betrugen zu 20 dpa ca. 56 %, 41 % bzw. 65 % des Wertes zur Reife bei 'Bomi', Risø 16 und Risø 13. Dies belegt, dass der Untersuchungszeitraum einen Großteil der Kornfüllungsphase repräsentiert. Anhand der Frisch- und Trockenmassen der Endosperme von 8 bis 20 dpa lässt sich ableiten, dass die Endosperme aller drei Genotypen die gleiche *Sink*-Kapazität besaßen, 'Bomi' jedoch in diesem Zeitraum besser als die Mutanten in der Lage war, Trockenmasse einzulagern. Die mittleren Trockenmassen der Endosperme von Risø 16 und Risø 13 betrugen 20 dpa 82,9 % bzw. 84,2 % derer von 'Bomi' (100 %). Für den Rohproteingehalt wurde ein linearer Zusammenhang mit der Trockenmasse im Untersuchungszeitraum festgestellt, welcher im Fall von 'Bomi' mit hoher Wahrscheinlichkeit bis zur Reife bestand. Die Rohproteingehalte betrugen zu 20 dpa 87,3 % und 82,7 % bei Risø 16 bzw. Risø 13 ('Bomi' = 100 %). Diese Daten zeigen, dass die N- und C-Einlagerung bzw. die Protein- und Stärkeakkumulation ins Endosperm bis 20 dpa nicht komplett unabhängig erfolgten. Es ist weiterhin nachgewiesen, dass die Bildungsdynamik der Proteinfractionen und die Proteinzusammensetzung im Endosperm durch die Mutationen im Stärkemetabolismus beeinflusst werden. Dabei fallen die Unterschiede zwischen den Mutanten trotz

verschiedener Defekte gering aus. Die Albumin/Globulin-Synthese ist im frühen Stadium nach der Anthese (bis ca. 14 - 20 dpa) bei den Mutanten gegenüber dem Wildtyp erhöht. Hierdurch wird die Bildung von Hordeinen gehemmt bzw. es steht weniger Stickstoff für die Bildung dieser Fraktion zur Verfügung, da die *Sink*-Stärke der AG-Fraktion für Stickstoff stärker ist [58]. Die Glutelin-Fraktion ist von diesen Vorgängen bis 14 dpa nicht beeinflusst. Nach ca. 14 dpa kommt es, zumindest bei Risø 16, zu einer partiellen Degradation der AG-Fraktion welche sich bis ca. 20 dpa fortsetzt. Der aus dieser Fraktion freigesetzte Stickstoff fließt möglicherweise z. T. in die GLU-Fraktion, da bei dieser zu 20 dpa die N_{GLU} -Menge gegenüber dem Wildtyp höher ausfiel.

Hinsichtlich des vier Tage vor Probenahme assimilierten Kohlenstoffs (^{13}C) ergab sich bei allen Genotypen ein ähnliches Bild. Die Einlagerung in die Blätter blieb von 8 bis 20 dpa unverändert, während sie in der Sprossachse zwischen 8 und 14 dpa tendenziell anstieg und von 14 bis 20 dpa konstant blieb. Der Überschuss im gesamten Haupttrieb stieg von 8 zu 20 dpa an, wobei das Maximum von 'Bomi' zu 20 dpa und den Mutanten zu 14 dpa erreicht wurde. Damit wurde ein steigender Beitrag der aktuellen C-Assimilation zur Kornfüllung am Haupttrieb im untersuchten Zeitraum nachgewiesen. Die Daten deuten stark darauf hin, dass eine *Source-Sink*-Beziehung zwischen Haupt- und Bestockungstrieben besteht, wobei der Haupttrieb mit zunehmender Endospermentwicklung zunehmend zur Kohlenstoffsenke wird. Die Daten zeigen weiterhin, dass die Kohlenstoffeinlagerung in das Endosperm bei den Mutanten bis 14 dpa der des Wildtyps entspricht, zwischen 14 und 20 dpa jedoch geringer ausfällt. Für den vier Tage vor Probenahme assimilierten Stickstoff (^{15}N) wurden ähnliche Verhältnisse beobachtet. Auch hier stieg der Überschuss im gesamten Haupttrieb von 8 zu 20 dpa an. Die Einlagerung in die vegetativen Organe war rückläufig, während der Anteil des Endosperms am Gesamt- ^{15}N des Haupttriebes im Mittel aller Genotypen von 33 % zu 8 dpa auf 76,2 % zu 20 dpa anstieg. Somit erfolgte der N-Fluss im Haupttrieb zum Endosperm mit dessen voranschreitender Entwicklung zunehmend gerichteter. Ein Rückgang des Beitrages der aktuellen N-Assimilation zur Kornfüllung wurde im Untersuchungszeitraum nicht beobachtet. Auf Proteinebene konnte anhand der ^{15}N -Überschusswerte gezeigt werden, dass Hordeine zu 14 und 20 dpa die stärkste Senke für aktuell assimilierten Stickstoff darstellen und es

gibt Hinweise, dass Hordeine und Gluteline aus unterschiedlichen N-Quellen gespeist werden.

Anhang I**Informationen zum ersten Hauptversuch (2009):**

Versuchszeitraum:	23.01.2009 - 29.04.2009
Versuchsort:	Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Lehr- und Forschungsstation Bereich Gewächshaus (S1 – Bereich), Lentzeallee 55 – 57, 14195 Berlin
Versuchsfragen:	Welche Auswirkungen hat die verringerte Stärkesyntheserate bei den <i>H. vulgare</i> Mutanten Risø 13 und Risø 16 auf die Stoffflüsse im Endosperm bzw. die C- und N-Verteilung in der Pflanze im Stadium nach der Anthese im Vergleich zum Wildtyp (‘Bomi’)?
Anmerkung:	Versuch im ersten Ansatz fehlgeschlagen (Pflanzen stark geschädigt: Blattflecken, Blattverbrennung, Infertilität, Ursache unklar, 15.10.2009 - 31.12.2009)
Pflanzenmaterial:	<i>H. vulgare</i> cv. ‘Bomi’, Mutanten Risø 16 und Risø 13
Versuchsumfang:	175 Pflanzen (inklusive Randpflanzen links und rechts an den Parzellen)
Versuchsaufbau:	randomisierter Gefäßversuch mit 5 Parzellen (Parzellen 14-tägig gewechselt um Auswirkungen von Gradienten zu vermeiden)
Kulturgefäße:	Durchmesser: 17 cm, Volumen: 1,5 l Füllmenge: 1 kg Substrat Pflanzdichte: 1 Pflanze pro Kulturgefäß
Substrat:	Komposterde ¹ : Substrat 2 (Klasmann) ² : Sand ³ , Verhältnis: 2 : 2 : 1, gedämpft

- ¹(FRUX, Aussaat und Pikierererde, Einheitserde- und Humuswerke Gebr. Patzer GmbH & Co KG, Waldsiedlung 4, D-36391, Sinntal-Jossa),
- ²(Substrat 2 für Topfpflanzen, Klasmann-Deilmann GmbH, Georg-Klasmann-Straße 2 – 10 D-49744, Geeste – Groß Hesepe),
- ³(Fresdorfer Feinsand, Kiessandlagerstätte 14552 Michendorf, Heide)
- Düngung:
1. Langzeitdünger Plantacote 4 M¹ im Ausgangssubstrat (2,0 g * l⁻¹ Erde)
 2. Schossergabe (BBCH 31, 02.03.2009) mit 150 ml einer 0,2%igen Hakaphos Grün² Düngelösung pro Gefäß
 3. Ährengabe (BBCH 47, 20.03.2009) mit 150 ml einer 0,2%igen Hakaphos Rot³ Düngelösung pro Gefäß
 4. zweite Ährengabe (BBCH 47, 20.03.2009) mit 150 ml einer 0,2%igen Hakaphos Rot³ Düngelösung pro Gefäß
- ¹(NPK-Dünger umhüllt 19 + 6 + 12; Wilhelm Haug GmbH & Co. KG, Düsseldorf),
- ²(NPK-Dünger mit Magnesium 20 + 5 + 10 (+ 2) mit Bor, Kupfer, Eisen, Mangan, Molybdän, Zink; COMPO GmbH & Co. KG, Münster),
- ³(NPK-Dünger mit Magnesium 8 + 12 + 24 (+ 4) mit Bor, Kupfer, Eisen, Mangan, Molybdän, Zink.; COMPO GmbH & Co. KG, Münster)
- Vorkeimung/Aussaat:
- Samen wurden für 2 d bei - 20 °C vernalisiert
- 20 Samen eines Genotyps pro Petrischale (je 1 Filterpapier über und unter Samen ausgelegt und mit deionisiertem Wasser gut befeuchtet)
- Vorkeimung für 24 h bei Dunkelheit & Raumtemperatur im Inkubationsschrank
- vorgekeimte Samen in Töpfe ausgelegt und mit ca.

	2 cm Erde bedeckt
Bewässerung:	von Hand, nach Bedarf
Temperatur:	Tag: 20 °C, Nacht: 16 °C (soweit regelbar)
Beleuchtung:	14 h pro Tag (7.00 – 21.00, Zusatzbeleuchtung bei Lichtstärke < 20 kLx)
	Einstellung Beschattungsanlage ab 31.03.2009 (Vertikale Beschattung hochgefahren bei 600 W Strahlung, 25 °C Außentemperatur, 24 °C Innentemperatur, Verzögerung 15 min)
Leuchtmittel:	Philips SON T Agro, 400 W (Abstand zu Tischoberfläche: 1.55 m)
Schädlingsbekämpfung:	20.02.2009, protektiv mit den systemischen Fungiziden Amistar ¹ und Gladio ² und dem Insektizid Karate Zeon ³ 0,4 ml Gladio, 0,5 ml Amistar, 37,5 µl Karate Zeon, Ausbringung: in 3,75 l H ₂ O bzw. 0,75 l * Parzelle ⁻¹ ¹ (250 g * l ⁻¹ Azoxystrobin, Syngenta Agro GmbH, Maintal) ² (375 g * l ⁻¹ Fenpropidin, 125 g/l Propiconazol, 125 g/l Tebuconazol, Syngenta Agro GmbH, Maintal) ³ (100 g * l ⁻¹ Lambda-Cyhalothrin, Syngenta Agro GmbH, Maintal)
Isotopenmarkierung:	4 d vor Probenahme um 10.00 Uhr 150 ml NH ₄ Cl-Lösung pro Gefäß
Wiederholungen pro Prüfglied:	4
Probleme/Fehler:	Blattflecken/-verbräunung: - traten besonders bei Risø 13 auf; zweite Düngung mit Hakaphos Rot erfolgte, um Nähr-

stoffmangel als Ursache auszuschließen

- Untersuchungen auf Pilzbefall nach vorheriger Inkubation von Blattmaterial in einer feuchten Kammer fielen negativ aus

Infertilität:

- trat bei vielen Pflanzen auf
- Im Versuchsplan vorgesehene 6 - 9 Wiederholungen pro Prüfglied konnten nicht realisiert werden
- Pflanzen, bei denen weniger als 10 Endosperme pro Ähre des Haupttriebes entwickelt waren, wurden nicht analysiert

Informationen zum zweiten Hauptversuch (2010):

Versuchszeitraum: 20.01.2010 - 27.04.2010

Versuchsort: Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Lehr- und Forschungsstation Bereich Gewächshaus (S1 – Bereich), Lentzeallee 55 – 57, 14195 Berlin

Versuchsfragen: Welche Auswirkungen hat die verringerte Stärkesyntheserate zum Zeitpunkt 20 dpa bei den *H. vulgare* Mutanten Risø 13 und Risø 16 auf die C- und N-Verteilung in der Pflanze und insbesondere im Endosperm im Stadium nach der Anthese im Vergleich zum Wildtyp (‘Bomi`)?

Welchen Einfluss haben die Bestockungstriebe auf die C- und N-Verteilung im Haupttrieb?

Anmerkung: Es wurde nur der Termin 20 dpa untersucht:

- als Wiederholung zum Hauptversuch 02
- Anzahl der Wiederholungen sollte größer sein

- Untersuchung aller Termine hätte Probenvolumen erzeugt, welches innerhalb der Projektlaufzeit nicht mehr aufzuarbeiten gewesen wäre

Untersuchung der Auswirkung der Bestockungstriebe:

- Dazu wurden im Zeitraum ab 12.02. - 15.02. (nicht alle Pflanzen synchron) 2010 die Bestockungstriebe entfernt. Die Pflanzen wurden im BBCH-Stadium 31 erstmals beschnitten. Im Anschluss wurden wöchentlich neu entstandene Bestockungstriebe bei den jeweiligen Pflanzen entfernt.
- Die Auswahl der beschnittenen Pflanzen erfolgte nach dem Losverfahren.

Pflanzenmaterial:	<i>H. vulgare</i> cv. 'Bomi', Mutanten Risø 16 und Risø 13
Versuchsumfang:	139 Pflanzen (60 für Beprobung, 30 als Reserve, 40 Randpflanzen, 9 für unmarkierte Kontrolle)
Versuchsaufbau:	randomisierter Gefäßversuch mit 4 Parzellen (Parzellen 14-tägig gewechselt um Auswirkungen von Gradienten zu vermeiden)
Kulturgefäße:	Durchmesser: 17 cm, Volumen: 1,5 l Füllmenge: 1 kg Substrat Pflanzdichte: 1 Pflanze pro Kulturgefäß
Substrat:	Komposterde : Substrat 2 (Klasmann) : Sand, Verhältnis: 2 : 2 : 1, gedämpft (Spezifikationen – siehe erster Hauptversuch)
Düngung:	1. Langzeitdünger Plantacote 4 M (Wilhelm Haug, Düsseldorf) im Ausgangssubstrat (2,0 g * l ⁻¹)

	Erde)
	<ol style="list-style-type: none"> 2. Schossergabe (BBCH 32, 01.03.2009) mit 150 ml einer 0,2%igen Hakaphos Grün-Düngelösung (Compo, Münster) pro Gefäß 3. 10.03.2010, 150 ml einer 0,2%igen Hakaphos Rot-Düngelösung (Compo, Münster) pro Gefäß 4. 17.03.2010, 150 ml einer 0,2%igen Hakaphos Rot-Düngelösung (Compo, Münster) pro Gefäß 5. 25.03.2010, unbeschnittene Pflanzen: 150 ml einer 0,2%igen Hakaphos Rot-Düngelösung (Compo, Münster) pro Gefäß, beschnittene Pflanzen: 150 ml einer 0,1%igen Hakaphos Rot-Düngelösung (Compo, Münster) pro Gefäß
Vorkeimung/Aussaat:	<p>Samen wurden für 2 d bei - 20 °C vernalisiert</p> <p>20 Samen eines Genotyps pro Petrischale (je 1 Filterpapier über und unter Samen ausgelegt und mit deionisiertem Wasser gut befeuchtet)</p> <p>Vorkeimung für 24 h bei Dunkelheit & Raumtemperatur im Inkubationsschrank</p> <p>vorgekeimte Samen in Töpfe ausgelegt und mit ca. 2 cm Erde bedeckt</p>
Bewässerung:	von Hand, nach Bedarf
Temperatur:	Tag: 20 °C, Nacht: 16 °C (soweit regelbar)
Beleuchtung:	<p>21.01.2010 - 11.02.2010: 12 h * d⁻¹ (7.00 - 19.00)</p> <p>12.02.2010 - 27.04.2010: 14 h * d⁻¹ (6.00 - 20.00)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Zusatzbeleuchtung, wenn Lichtstärke < 20 kLx - Vertikale Beschattung bei 600 W Strahlung,

	mind. 25 °C Außentemperatur und mind. 24 °C Innentemperatur hochgefahren, Verzögerung 15 min
Leuchtmittel:	Philips SON T Agro, 400 W (Abstand zu Tischoberfläche: 1.55 m)
Schädlingsbekämpfung:	12.02.2010, protektiv mit den systemischen Fungiziden Amistar und Gladio, Insektizid Karate Zeon da Verdacht auf Thripsbefall (Gladio: 0,32 ml, Amistar: 0,4 ml, Karate Zeon: 30 µl, Ausbringung in 4,0 l H ₂ O bzw. 0,8 l * Parzelle ⁻¹) 01.03.2010, Wiederholung der Behandlung (Erhöhung des Wasservolumens auf 5 l bei gleichem Wirkstoffgehalt)
Isotopenmarkierung:	4 d vor Probenahme um 10.00 Uhr 150 ml NH ₄ Cl-Lösung pro Gefäß
Wiederholungen pro Prüfglied:	7 (nur unbeschnittene Pfl.)
Probleme/Fehler:	Infertilität: <ul style="list-style-type: none">- Ähren der beschnittenen Pflanzen waren nahezu ausnahmslos infertil – Untersuchung der Auswirkung der Bestockungstriebe nicht möglich- Teilweise trat auch bei beschnittenen Pflanzen teilweise oder komplette Infertilität an der Ähre des Haupttriebes auf. Bei weniger als 10 entwickelten Endospermen pro Ähre des Haupttriebes wurden die Pflanzen verworfen. Düngung: <ul style="list-style-type: none">- Im Stadium BBCH 37 fingen die Pflanzen an, Blattverbräunung zu zeigen. Um Nährstoff-

mangel auszuschließen, wurden die Pflanzen ab diesem Zeitpunkt bis zur Anthese wöchentlich mit Hakaphos Rot gegossen.

Literaturverzeichnis

- 1 Pott R. (2005): Vier Millionen Jahre Mensch - Schritte der Menschheits- und Kulturevolution. In: Allgemeine Geobotanik - Biogeosysteme und Biodiversität. Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg, S. 233 - 242, ISBN 10: 3-540-23058-0
- 2 Bremer B., Bremer K., Chase M., Fay M., Reveal J., Soltis D., Soltis P., Stevens P. (2009): An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: AGP III. Botanical Journal of the Linnean Society. 161:2, S. 105 - 121
- 3 Bäßler M., Jäger E.J., Werner K. (1999): Exkursionsflora von Deutschland / begr. von Werner Rothmaler. Band 2 - Gefäßpflanzen. Grundband. - 17. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg - Berlin, ISBN 10: 3-334-60831-X
- 4 Gutte P., Möschke M. (1998): Botanik für Veterinärmediziner. - 2. überarbeitete Auflage, Verlag Wissenschaftliche Scripten, Zwickau, S. 109 - 112, ISBN 10: 3-928-92118-5
- 5 Gomez-Macpherson H. (2001): Hordeum vulgare. EcoPort Entity 1232, <http://www.ecoport.org>, 16.11.2010
- 6 Taiz L., Zeiger E. (2002): Chapter 20 - Gibberelins: Regulators of Plant Height. In: Plant Physiology. - 3rd Edition, Sinauer Associates Inc., Sunderland (USA), ISBN 10: 0-878-93823-0
- 7 Sitte P., Ziegler H., Ehrendorfer F., Bresinsky A. (2002): Strasburger, Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. - 35. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, ISBN 10: 3-827-41010-X
- 8 Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://faostat.fao.org>, 17.11.2010
- 9 Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Abteilung 4, Agrarmärkte, Planungsgrundlagen, Sozialordnung, Referat 425 (2009): Besondere Ernte- und Qualitätsermittlung (BEE) 2009. Reihe: Daten-Analysen. <http://www.bmelv-statistik.de>, 17.11.2010
- 10 Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Environment Directorate: OECD Environmental Health and Safety Publications (2004): Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Barley (*Hordeum vulgare* L.): Key Food and Feed Nutrients and Anti-Nutrients. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds, No. 12, Paris, <http://www.oecd.org>, 10.11.2010

- 11 von Ubisch G. (1920): Anwendung der Vererbungsgesetze auf die Kulturpflanzen. *Die Naturwissenschaften*. 8:16, S. 293 - 299,
- 12 Australian Government, Department of Health and Ageing Office of the Gene Technology Regulator (2008): The Biology of *Hordeum vulgare* L. (barley). Version 1,
[http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/barley-3/\\$FILE/biologybarley08.pdf](http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/barley-3/$FILE/biologybarley08.pdf), 10.11.2010
- 13 THOMAS A., CHEN S. (2004): Landwirtschaft und klimatische Trends im zentralen Yarlong Tsangpo-Tal, Tibet. *Erdkunde*. 56:4, S. 371 - 384
- 14 YOUNG K. (2001): Barley: Soil and climatic requirements. In: Soilguide – A handbook for understanding and managing agricultural soils. Hrsg.: MOORE G., Bulletin 4343. Agriculture Western Australia, Perth (Western Australia), S. 268 - 269, ISBN 10: 0-730-70057-7
- 15 KLINGLER R.W. (1995): Kapitel 3 - Getreidearten. In: Grundlagen der Getreidetechnologie. Behr's Verlag GmbH & Co., Hamburg, S. 36, ISBN 10: 3-860-22228-7
- 16 SAVIN R., NICOLAS M.E. (1996): Effects of short periods of drought and high temperature on growth and starch accumulation of two malting barley cultivars. *Australian Journal of Plant Physiology*, 23:2, S. 201 - 210
- 17 SCHELLING K., BORN K., WEISSTEINER C., KÜHBAUCH W. (2003): Relationships between yield and quality parameters of malting barley (*Hordeum vulgare* L.) and phenological and meteorological data. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 189:2, S. 113 - 122
- 18 LATSCHA H.P., KAZMAIER U. (2008): Kapitel 2 - Aufbau der Atome. In: Chemie für Biologen. - 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg, S. 8 - 14, ISBN 13: 978-3-540-78842-3
- 19 FALLERT-MÜLLER A. (1999/2000): Lexikon der Biochemie in zwei Teilen. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin - Heidelberg, S. 510 - 512, ISBN 10: 3-827-41580-2
- 20 NILSEN E.T., ORCUTT D.M. (1996): The physiology of plants under stress: abiotic factors. John Wiley & Sons Inc., New York, S. 200 - 230, ISBN 10: 0-471-03152-6
- 21 STROPPE H. (1994): Physik: für Studenten der Natur- und Technikwissenschaften: ein Lehrbuch zum Gebrauch neben der Vorlesung. - 10. verbesserte Auflage, Fachbuchverlag Leipzig GmbH, Leipzig - Köln, ISBN 10: 3-343-00856-7

-
- 22 Mook W.G. (2000): Volume I: Introduction: Theory, Methods, Review. Hrsg.: Mook W.G.: Environmental Isotopes in the Hydrological Cycle: Principles and Applications. Band IHP-V, Technical Documents in Hydrology 39, UNESCO/IAEA, Paris, http://www-naweb.iaea.org/napc/ih/IHS_resources_publications_hydroCycle_en.html, 20.10.2010
- 23 CZESLIK C., SEEMANN H., WINTER R. (2009): Basiswissen Physikalische Chemie. - 3. Auflage, Vieweg + Teubner - GWV Fachverlage GmbH, Wiesbaden, S. 317 - 322, ISBN 13: 978-3-8351-0253-8
- 24 JUNK G., SVEC H.V. (1958): The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. *Geochem. Cosmochim. Acta.* 14, S. 234 - 243
- 25 FARQUHAR G.D., EHRLINGER J.R., HUBICK K.T. (1989): Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Bio.*, 40, S. 503 - 537
- 26 BEDARD-HAUGHN A., VAN GROENINGEN J.W., VAN KESSEL C. (2003): Tracing ^{15}N through landscapes: potential uses and precautions. *Journal of Hydrology*, 272, S. 175 - 190
- 27 XINHUA HE X., XU M., QIU G.Y., ZHOU J. (2009): Use of ^{15}N stable isotope to quantify nitrogen transfer between mycorrhizal plants. *Journal of Plant Ecology*, 2:3, S. 107 - 118
- 28 DE GROOT P.A. (2009): Handbook of stable isotope analytical techniques. Band 2, Elsevier, Amsterdam (Niederlande), XVI-XVIII, ISBN 13: 978-0-444-51115-7
- 29 DOLL H. (1983): Barley seed proteins and possibilities for their improvement. Hrsg.: GOTTSCHALK W., MÜLLER H.P.: Seed Proteins: Biochemistry, Genetics, Nutritive Value. M. Nijhoff / Dr. W. Junk Publishers, Den Haag (Niederlande), S. 207 - 223, ISBN 10: 9-024-72789-8
- 30 CLIQUET J.B., DELÉENS E., MARIOTTI A. (1990): C and N mobilization from stalk and leaves during kernel filling by ^{13}C and ^{15}N tracing in *Zea mays* L.. *Plant Physiology*, 94, S. 1547 - 1553
- 31 TESTER R.F., MORRISON W.R., SCHULMAN A.H. (1993): Swelling and gelatinization of cereal starches. V. Risø mutants of Bomi and Carlsberg II barley cultivars. *Journal of Cereal Science*, 17, S. 1 - 9
- 32 PATRON N.J., GREBER B., FAHY B.F., LAURIE D.A., PARKER M.L., DENYER K. (2004): The *lys5* mutations of barley reveal the nature and importance of plastidial ADP-Glc transporters for starch synthesis in cereal endosperm. *Plant Physiology*, 135, S. 2088 - 2097

-
- 33 SHEWRY P.R., HILL J.M., PRATT H.M., LEGGATT M.M., MIFLIN B.J. (1978): An evaluation of techniques for the extraction of hordein and glutelin from barley seed and a comparison of the protein composition of Bomi and Risø 1508. *Journal of Experimental Botany*, 29:110, S. 677 - 692
- 34 LINKO R., LAPVETELÄINEN A., LAAKSO P., KALLIO H. (1989): Protein composition of a high-protein barley flour and barley grain. *Cereal Chem.*, 66:6, S. 478 - 482
- 35 TRIBOÏ E., MARTRE P., TRIBOÏ-BLONDEL A.-M. (2003): Environmentally-induced changes in protein composition in developing grains of wheat are related to changes in total protein content. *Journal of Experimental Botany*, 45:388, S. 1731 - 1742
- 36 SHEWRY P.R., FIELD J.M., KIRKMAN M.A., FAULKS A.J., MIFLIN B.J. (1980): The extraction, solubility, and characterization of two groups of barley storage polypeptides. *Journal of Experimental Botany*, 31:121, S. 393 - 407
- 37 RAHMAN S., SHEWRY P.R., MIFLIN B.J. (1982): Differential protein accumulation during barley grain development. *Journal of Experimental Botany*, 33:135, S. 717 - 728
- 38 LIN C.L., KAO C.H. (1995): NaCl stress in rice seedlings: starch mobilization and the influence of gibberellic acid on seedling growth. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 36, S. 169 - 173
- 39 BIOCOM Projektmanagement GmbH (2007): Das Genom der Gerste im Visier der Wissenschaft, <http://www.biotechnologie.de/BIO/Navigation/DE/Service/suche,did=65630.html?listBIId=74568&searchText=gerste>, 08.12.2010
- 40 EMES M.J., BOWSHER C.G., HEDLEY C., BURRELL M.M., SCRASE-FIELD E.S.F., TETLOW I.J. (2003): Starch synthesis and carbon partitioning in developing endosperm. *Journal of Experimental Botany*, 54:382, S. 569 - 575
- 41 BRIARTY L.G., HUGHES C.E., EVERS A.D. (1979): The developing endosperm of wheat - a stereological analysis. *Annals of Botany*, 44, S. 641 - 658
- 42 NEWMAN R.K., NEWMAN C.W. (2008): 2 - Barley: Taxonomy, Morphology and Anatomy; 4 - Barley: Genetics and Nutrient Composition . Barley for food and health - science, technology, and products. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, ISBN 13: 978-0-470-10249-7

-
- 43 ÅMAN P., NEWMAN C.W. (1986): Chemical composition of some different types of barley grown in Montana, U.S.A.. *Journal of Cereal Science*, 4, S. 133 - 141
- 44 DUFFUS C.M., COCHRANE M.P. (1993): Formation of the barley grain: morphology, physiology, and biochemistry. Hrsg.: MACGREGOR A.W., BHATTY R.S.: Barley: chemistry and technology. Association of Cereal Chemistry, Inc., St. Paul, Minnesota, U.S.A., S. 31 - 72, ISBN 10: 0-913-25080-5
- 45 BACH KNUDSEN K.E., ÅMAN P., EGGUM B.O. (1987): Nutritive value of danish-grown barley varieties, I, Carbohydrates and other major constituents. *Journal of Cereal Science*, 6, S. 173 - 186
- 46 GRIFFEY C., BROOKS W., KURANTZ M., THOMASON W., TAYLOR F., OBERT D., MOREAU R., FLORES R., SOHN M., HICKS K. (2010): Grain composition of Virginia winter barley and implications for use in feed, food, and biofuels production. *Journal of Cereal Science*, 51, S. 41 - 49
- 47 JOHNSON P.E., PATRON N.J., BOTTRILL A.R., DINGES J.R., FAHY B.F., PARKER M.L., WAITE D.N., DENYER K. (2003): A low-starch barley mutant, Risø 16, lacking the cytosolic small subunit of ADP-Glucose Pyrophosphorylase, reveals the importance of the cytosolic isoform and the identity of the plastidial small subunit. *Plant Physiology*, 131, S. 684 - 696
- 48 WESCHKE W., PANITZ R., SAUER N., WANG Q., NEUBOHN B., WEBER H., WOBUS U. (2000): Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *The Plant Journal*, 21:5, 455 - 467
- 49 DRECCER M.F., GRASHOFF C., RABBINGE R. (1997): Source-sink ratio in barley (*Hordeum vulgare* L.) during grain filling: effects of senescence and grain protein concentration. *Field Crops Research*, 49, S. 269 - 277
- 50 NEUHAUS H.E., EMES M.J. (2000): Nonphotosynthetic metabolism in plastids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51, S. 111 - 140
- 51 DENYER K., DUNLAP F., THORBJØRNSSEN T., KEELING P., SMITH A.M. (1996): The major form of ADP-glucose pyrophosphorylase in maize endosperm is extra-plastidial. *Plant Physiology*, 112, S. 779 - 785
- 52 THORBJØRNSSEN T., VILLARD P., DENYER K., OLSEN O.A., SMITH A.M. (1996): Distinct isoforms of ADP-glucose pyrophosphorylase occur inside and outside the amyloplasts in barley endosperm. *Plant Journal*, 10, S. 243 - 250

-
- 53 OSBORNE T.B. (1895): The proteins of barley. *Journal American Chemical Society*, 17, S. 539 - 567
- 54 SHEWRY P.R. (1993): Barley seed proteins. Hrsg.: MacGregor A.W., Bhatta R.S.: Barley: chemistry and technology. American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul (Minnesota, USA), S. 131 - 197, ISBN 10: 0-913-25080-5
- 55 SHEWRY P.R., TATHAM A.S. (1990): The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evaluation. *Biochem. J.*, 267, S. 1 - 12
- 56 SHEWRY P.R., PRATT H.M., LEGGATT M., MIFLIN B.J. (1979): Protein metabolism in developing endosperms of high lysine and normal barley. *Cereal Chem.*, 56:2, S. 110 - 117
- 57 RAHMAN S., KREIS M., FORDE B.G., SHEWRY P.R., MIFLIN B.J. (1984): Hordeine-gene expression during development of the barley (*Hordeum vulgare*) endosperm. *Biochem J.*, 233, S. 315 - 322
- 58 KIRKMAN M.A., SHEWRY P.R., MIFLIN B.J. (1982): The effect of nitrogen nutrition on the lysine content and protein composition of barley seeds. *J. Sci. Food Agric.*, 33, S. 115 - 127
- 59 DAI F., WANG J., ZHANG S., XU Z., ZHANG G. (2007): Genotypic and environmental variation in phytic acid content and its relation to protein content and malt quality in barley. *Food chemistry*, 105, S. 606 - 611
- 60 WANG J.M., CHEN J.X., DAI F., WU F.B., YANG J.M., ZHANG G.P. (2007): Protein fractions in barley grains as affected by some agronomic factors and their relationships to malt quality. *Cereal Research Communication*, 35:1, S. 129 - 140
- 61 SAVIN R., PRYSTUPA P., ARAUS J.L. (2006): Hordein composition as affected by post-anthesis source-sink ratio under different nitrogen availabilities. *Journal of Cereal Science*, 44, S. 113 - 116
- 62 DONOVAN G.R., LEE J.W. (1977): The growth of detached wheat heads in liquid culture. *Plant Sci. Lett.*, 9, S. 107 - 113
- 63 YONEYAMA T., TAKEBA G. (1984): Compartment analysis of nitrogen flows through mature leaves. *Plant Cell Physiology*, 25, S. 39 - 48
- 64 MATTSON M., LUNDBORG T., LARSSON C.-M. (1993): Nitrogen utilization in N-limited barley during vegetative and generative growth. *Journal of Experimental Botany*, 44:260, S. 537 - 546

-
- 65 KELTJENS W.G., NIEUWENHAUS J.W., NELMANS J.A. (1986): Nitrogen retranslocation in plants of maize, lupin and cocklebur. *Plant and Soil*, 91, S. 323 - 327
- 66 FISHER D.B., MACNICOL P.K. (1986): Amino acid composition along the transport pathway during grain filling in wheat. *Plant Physiol.*, 82, S. 1019 - 1023
- 67 SHEWRY P.R., TATHAM A.S., HALFORD N.G. (2001): Nutritional control of storage protein synthesis in developing grain of wheat and barley. *Plant Growth Regulation*, 34, S. 105 - 111
- 68 EGELE K., BESCHOW H., MERBACH W. (2008): Assessing post-anthesis nitrogen uptake, distribution and utilisation in grain protein synthesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) using ¹⁵N fertiliser and ¹⁵N proteinogenic and non-proteinogenic amino acids. *Annals of applied Biology*, 152, S. 209 - 221
- 69 VAN SANFORD D.A., MACKOWN C.T. (1987): Cultivar differences in nitrogen remobilization during grain fill in soft red winter wheat. *Crop Science*, 27, S. 295 - 300
- 70 PEOPLES M.B., DALLING M.J. (1988): The interplay between proteolysis and amino acid metabolism during senescence and nitrogen reallocation. Hrsg.: NOODÉN L.D., LEOPOLD A.C.: Senescence and ageing in plants. Academic Press, San Diego, S. 181 - 217, ISBN 10: 0-125-20920-7
- 71 PAPAKOSTA D.K., GAGIANAS A.A. (1995): Nitrogen and dry matter accumulation, remobilization, and losses from mediterranean wheat during grain filling. *Agronomy Journal*, 83, S. 864 - 870
- 72 OLSEN O.-A., LINNESTAD C., NICHOLS S.E. (1999): Developmental biology of the cereal endosperm. *Trends in Plant Science*, 4:7, S. 253 - 257
- 73 BRIGGS D.E. (1978): Barley. Chapman and Hall Ltd., London, ISBN 13: 978-0412118708
- 74 FAO (2003): Food energy - methods of analysis and conversion factors: Report on a technical workshop, Rome, 3-6 December 2002. Hrsg.: Food and Agriculture Organization of the United Nations: *FAO FOOD AND NUTRITION PAPER*, 77, S. 7 - 11, 0254-4725
- 75 JONES D.B. (1931): Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of protein. *USDA Circular*, 183, S. 1 - 21

-
- 76 FAUST H., BORNHAK H., HIRSCHBERG K., JUNG K., JUNGHANS P., KRUMBIEGEL P. (1981): ^{15}N -Anwendungen in der Biochemie, Landwirtschaft und Medizin. *Isocommerz Schriftenreihe*, 5
- 77 KÖHLER W., SCHACHTEL G., VOLESKE P. (2007): Biostatistik. - 4. Auflage Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, S. 109 ff., ISBN 13: 957-3-540-37710-8
- 78 BÜHNER M., ZIEGLER M. (2009): Statistik für Biologen und Sozialwissenschaftler. Pearson Studium, München - Boston, ISBN 13: 978-3-8273-7274-1
- 79 Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (1976): VDLUFA - Methodenbuch. Band Methodenbuch Band III - Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. - 3. Auflage VDLUFA-Verlag, Darmstadt, ISBN 10: 3-922-71214-2
- 80 RÖSTI S., RUDI H., RUDI K., OPSAHL-SORTEBERG H.-G., FAHY B., DENYER K. (2006): The gene encoding the cytosolic small subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase in barley endosperm also encodes the major plastidial small subunit in the leaves. *Journal of Experimental Botany*, 57:14, S. 3619 - 3626
- 81 LAWLOR D.W. (2002): Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. *Journal of Experimental Botany*, 53, S. 789 - 799
- 82 YAMAGATA M., KOUCHI H., YONEYAMA T. (1987): Partitioning and utilization of photosynthate produced at different growth stages after anthesis in soybean (*Glycine max* L. Merr.). Analysis by long-term ^{13}C -labeling experiments. *Journal of Experimental Botany*, 38, S. 1247 - 1259
- 83 PRIOUL J.L., REYSS A., SCHWEBEL-DUGUÉ N. (1990): Relationships between carbohydrate metabolism in ear and adjacent leaf during grain filling in maize genotypes. *Plant Physiol Biochem.*, 28, S. 485 - 493
- 84 GEBBING T., SCHNYDER H., KÜHBAUCH W. (1999): The utilization of pre-anthesis reserves in grain filling of wheat. Assessment by steady-state $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ labelling. *Plant, Cell and Environment*, 22, S. 851 - 858
- 85 GALLAGHER J.N., BISCOE P.V., SCOTT R.K. (1975): Barley and its environment. V. Stability of grain weight. *Journal of Applied ecology*, 12, S. 319 - 336
- 86 GALLAGHER J.N., BISCOE P.V., HUNTER B. (1976): Effects of drought on grain growth. *Nature*, 264, S. 541 - 542

-
- 87 BARNEIX A.J. (2007): Physiology and biochemistry of source-regulated protein accumulation in the wheat grain. *Journal of Plant Physiology*, 164, S. 581 - 590
- 88 MASCLAUX-DAUBRESSE C., REINSdorf-CREN M., ORSEL M. (2008): Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biology*, 10, S. 23 - 36
- 89 VOLTAS J., ROMAGOSA I., ARAUS J.L. (1997): Grain size and nitrogen accumulation in sink-reduced barley under mediterranean conditions. *Field Crops Research*, 52, S. 117 - 126
- 90 MARTRE P., PORTER J.R., JAMIESON P.D., TRIBOÏ E. (2003): Modelling grain nitrogen accumulation and protein composition to understand the sink/source regulations of nitrogen remobilization for wheat. *Plant Physiology*, 133, S. 1959 - 1967
- 91 TRIBOÏ E., MARTRE P., TRIBOÏ-BLONDEL A.-M. (2003): Environmentally-induced changes in protein composition in developing grains of wheat are related to changes in total protein content. *Journal of Experimental Botany*, 54:388, S. 1531 - 1742
- 92 GUPTA R.B., MASCI S., LAFIANDRA D., BRIANA H.S., MACRITCHIE F. (1996): Accumulation of protein subunits and their polymers in developing grains of hexaploid wheats. *Journal of Experimental Botany*, 47, S. 1377 - 1385
- 93 TRIBOÏ E., TRIBOÏ-BLONDEL A.-M. (2002): Productivity and grain or seed composition: a new approach to an old problem. *Eur. J. Agron.*, 16, S. 163 - 186
- 94 GIESE H., ANDERSEN B., DOLL H. (1983): Synthesis of the major storage protein, hordein, in barley. *Planta*, 159, S. 60 - 65
- 95 BISHOP L.R. (1929): The composition and quantitative estimation of barley proteins. *J. Inst. Brew.*, 35, S. 101 - 118
- 96 WILSON C.M., SHEWRY P.R., FAULKS A.J., MIFLIN B.J. (1981): The extraction and separation of barley glutelins and their relationship to other endosperm proteins. *Journal of Experimental Botany*, 32:131, S. 1287 - 1293
- 97 CHEMLÍK J., ŘEHULKA P., STŘELCOVA M., KUBÁŇ, MAYRHOFER C., ALLMAIER G. (2002): Proteomic analysis of different extracts from barley grains. *Rostlinná Výroba*, 48:6, S. 261 - 264

-
- 98 SHEWRY P.R., FAULKS A.J., MIFLIN B.J. (1980): Effect of high-lysine mutations on the protein fractions of barley grain. *Biochemical Genetics*, 18, S. 133 - 151
- 99 MARSCHNER H. (1985): Mineral nutrition of higher plants. - 2nd edition, Academic Press, London, ISBN 10: 0-124-73543-6
- 100 XU Q.F., TSAI C.L., TSAI C.Y. (1992): Interaction of potassium with the form and amount of nitrogen nutrition on growth and nitrogen uptake of maize. *J. Plant Nutr.*, 15, S. 23 - 33
- 101 IKEDA H. (1991): Utilization of nitrogen by vegetable crops. *JARQ*, 25:2, S. 117 - 124
- 102 BROMAND S., WHALEN J.K., JANZEN H.H., SCHJOERRING J.K., ELLERT B.H. (2001): A pulse-labelling method to generate ^{13}C -enriched plant materials. *Plant and Soil*, 235, S. 253 - 257
- 103 EVANS R.D. (2007): Soil nitrogen isotope composition. Hrsg.: MICHENER R., LAJTHA K.: Stable isotopes in ecology and environmental science. - 2nd edition, Blackwell Publishing, Oxford (UK), S. 84 - 95, ISBN 10: 1-405-12680-9
- 104 EVANS R.D. (2001): Physiological mechanisms influencing plant nitrogen isotope composition. *Trends in Plant Science*, 6:3, S. 121 - 126
- 105 NADELHOFFER K.J., FRY B. (1994): Nitrogen isotope studies in forest ecosystems. Hrsg.: MICHENER R., LAJTHA K.: Stable Isotopes in ecology and environmental science. - 1st edition, Blackwell Publishing, Oxford (UK), ISBN 10: 0-632-03154-9
- 106 KRAMER M.G., SOLLINS P., SLETTEN R.S., SWART P.K. (2003): N isotope fractionation and measures of organic matter alteration during decomposition. *Ecology*, 84, S. 2021 - 2025
- 107 COOPER H.D., CLARKSON D.T. (1989): Cycling of amino-nitrogen and other nutrients between shoots and roots in cereals - A possible mechanism integrating shoot and root in the regulation of nutrient uptake. *Journal of Experimental Botany*, 40:216, S. 753 - 762
- 108 ELLIS R.P., MARSHALL B. (1998): Growth, yield and grain quality of barley (*Hordeum vulgare* L.) in response to nitrogen uptake. *Journal of Experimental Botany*, 49:323, S. 1021 - 1029
- 109 PAULY D.G., NYBORG M., MALHI S.S. (2002): Controlled-release P fertilizer concept evaluation using growth and P uptake of barley from three

- soils in a greenhouse. *Canadian Journal of Soil Science*, 82:2, S. 201 - 210
- 110 SPRATT E.D., GASSER J.K.R. (1970): Effects of fertilizer nitrogen and water supply on the distribution of dry matter and nitrogen between the different parts of wheat. *Canadian Journal of Plant Science*, 50, S. 613 - 625
- 111 GARCÍA DEL MORAL M.B., GARCÍA DEL MORAL L.F. (1995): Tiller production and survival in relation to grain yield in winter and spring barley. *Field Crops Research*, 44, S. 85 - 93
- 112 BONNETT G.D., INCOLL L.D. (1992): The potential pre-anthesis and post-anthesis contributions of stem internodes to grain yield in crops of winter barley. *Annals of Botany*, 69, S. 219 - 225
- 113 RAWSON H.M., EVANS L.T. (1971): The contribution of stem reserves to grain development in a range of wheat cultivars of different heights. *Australian Journal of Agricultural Research*, 22, S. 851 - 863
- 114 FORD M.A., BLACKWELL R.D., PARKER M.L. (1979): Associations between stem solidity, soluble carbohydrate accumulation and other characters in wheat. *Annals of Botany*, 44, S. 731 - 738
- 115 CORBELLINI M., BORCHI B. (1985): Accumulation and remobilization of dry matter and protein in four bread wheat varieties. *Zeitschrift für Acker- und Pflanzenbau*, 155, S. 1 - 11
- 116 LAUER J.G., SIMMONS S.R. (1988): Photoassimilate partitioning by tillers and individual tiller leaves in field-grown spring barley. *Crop Science*, 28, S. 279 - 282
- 117 FATHI G., McDONALD G.K., LANCE R.C.M. (1997): Effects of post-anthesis water stress on the yield and grain protein concentration of barley grown at two levels of nitrogen. *Australian Journal of Agricultural Research*, 48, S. 67 - 80
- 118 CHAFAI EL-A., SIMMONS S.R., CROOKSTON R.K. (1992): Allocation of photoassimilate by main shoots and nonsurviving tillers in barley. *Crop Science*, 32, S. 1233 - 1237
- 119 KOBATA T., PALTA J.N., TURNER N.C. (1992): Rate of development of post-anthesis water deficits and grain filling in spring wheat. *Crop Science*, 32, S. 1238 - 1242

-
- 120 PALTA J.A., KOBATA T., TURNER N.C., FILLERY I.R. (1994): Remobilization of carbon and nitrogen in wheat as influenced by postanthesis water deficits. *Crop Science*, 34, S. 118 - 124
- 121 MUURINEN S., KLEEMOLA J., PELTONEN-SAINIO P. (2007): Accumulation and translocation of nitrogen in spring cereal cultivars differing in nitrogen use efficiency. *Agronomy Journal*, 99, S. 441 - 449
- 122 WARDLAW I.F., PORTER H.K. (1967): The redistribution of stem sugars in wheat during grain development. *Australian Journal of Biological Science*, 20, S. 309 - 318
- 123 DANIELS R.W., ALCOCK M.B., SCARISBRICK D.H. (1982): A reappraisal of stem contribution to grain yield in spring barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Agricultural Science*, 98, S. 347 - 355.
- 124 FUERTES-MENDIZÁBAL T., SETIÉN I., ESTAVILLO J.M., GONZÁLES-MORO M.B. (2010): Late nitrogen fertilization affects carbohydrate mobilization in wheat. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 173, S. 907 - 919
- 125 LEMAÎTRE T., GAUFICHON L., BOUTET-MERCY S., CHRIST A., MASCLAUX-DAUBRESSE C. (2008): Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana* Wassileskija Accession. *Plant Cell Physiol.*, 7, S. 1056 - 1065
- 126 BARLOW C.W.R., DONOVAN G.R., LEE J.W. (1983): Water relations and composition of wheat ears grown in liquid culture: effect of carbon and nitrogen. *Australian Journal of Plant Physiology*, 10, S. 99 - 108
- 127 Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, GABI Geschäftsstelle: SYS SEED Integrierte Modellierung des Primärstoffwechsels des sich entwickelnden Gersten-Endosperms unter dem Einfluss hormonaler Regulierung. Am Mühlberg 1, D-14476 Potsdam, <http://www.gabi.de/projekte-alle-projekte-neue-seite-152.php>, 11.07.2011
- 128 AKAR T., AVCI M., DUSUNCELI F. (2004): Chapter XXXI - Barley: post-harvest operations. Hrsg.: MEJÍA D. (AGST/FAO): *Compendium on Post-harvest operations*. <http://www.fao.org>, 01.03.2011
- 129 i.m.a.-information.medien.agrar e.V. (Berlin): <http://www.agrilexikon.de/index.php?id=gerste>, 18.07.2011
- 130 PALTA J.A., FILLERY I.R.P. (1995): N application enhances remobilization and reduces losses of pre-anthesis N in wheat grown on a duplex soil. *Aust. J. Agric. Res.*, 46, S. 519 - 531

-
- 131 JENNER C.F., UGALDE T.D., ASPINALL D. (1991): The physiology of starch and protein deposition in the endosperm of wheat. *Australian Journal of Agricultural Research*, 18, S. 211-226
 - 132 MARTÍNEZ-CARRASCO R., THORNE G.N. (1979): Physiological factors limiting grain size in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 30, S. 669-679
 - 133 MA Y.Z., MACKOWN C.T., VAN SANFORD D.A. (1995): Kernel mass and assimilate accumulation in wheat: cultivar responses to 50 % spikelet removal at anthesis. *Field Crops Research*, 42, S. 93-99
 - 134 NEVO E. (1992): Chapter 2 - Origin, evolution, population genetics and resources for breeding of wild barley, *Hordeum spontaneum*, in the fertile crescent. Hrsg.: SHEWRY P.R. Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology. C.A.B. International, Wallingford, Oxon (U.K.), S. 19-43, ISBN 10: 0-851-98725-7
 - 135 HOEFS J. (2009): Stable isotope geochemistry. - 6th edition, Springer Verlag, Berlin - Heidelberg, S. 4-33, ISB 13: 978-3-540-70703-5

Danksagung

Diese Dissertation wäre ohne die Unterstützung und Motivation meiner Kollegen an Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin sowie meiner Familie nicht entstanden. Ich bin Euch allen zu großem Dank verpflichtet!

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Klaus-Peter Götz, der jederzeit ein offenes Ohr für meine Fragen hatte, mich in zahllosen Gesprächen von seinem Erfahrungsschatz profitieren ließ, auf neue Ideen brachte und mich stets motivierte, die Dissertation weiter voranzutreiben.

Kein geringerer Dank gebührt meinem Doktorvater Prof. Dr. Helmut Herzog sowie Prof. Dr. habil. Eckhard George für die Begutachtung der Arbeit.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät, die mich bei der Durchführung der Arbeiten im Rahmen dieser Dissertation unterstützt haben, ganz besonders Susanne Moryson, Christel Scheibe und Manuela Alt. Nadja Fiensch danke ich für die Hilfestellung bei administrativen Fragen und die motivierenden Gespräche in schwierigen Zeiten.

Herrn Prof. Dr. K. D. Wutzke (Universität Rostock, Forschungslabor Gastroenterologie und Ernährung) danke ich für die Durchführung der ^{13}C -Messungen ebenso wie Frau Dr. Winfriede Weschke und Herrn Dr. Hans Weber vom IPK-Gatersleben für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des GABI SysSeed-Projektes.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern. Ohne sie hätte ich Beruf und Vaterpflichten nicht vereinigen können und die Dissertation nicht in diesem Zeitrahmen anfertigen können. Ich danke Euch aus tiefstem Herzen für alles, was Ihr für mich getan habt!

Zu guter Letzt danke ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), ohne dessen Finanzierung des GABI SysSeed-Projektes die praktischen Arbeiten für diese Dissertation nicht durchführbar gewesen wären.